



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VÝVOJ ENERGETICKÝCH NÁPOJŮ NOVÉHO TYPU S
OBSAHEM PŘÍRODNÍCH AKTIVNÍCH SLOŽEK**

DEVELOPMENT OF A NEW TYPE OF ENERGY DRINKS CONTAINING NATURAL ACTIVE COMPONENTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Marie Vysoká

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1001/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Marie Vysoká**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petra Matoušková, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Vývoj energetických nápojů nového typu s obsahem přírodních aktivních složek

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) přehled energetických nápojů, jejich hlavních složek a metod analýzy obsahu aktivních látek
- 2) návrh vhodných přírodních složek a formy jejich přidavku do energetických nápojů
- 3) vývoj metod pro analýzu složek komplexních přírodních extraktů
- 4) komplexní charakterizace nově navržených nápojů, účinky a dlouhodobá stabilita, senzorická analýza

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Marie Vysoká
student(ka)

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce byla zaměřena na vývoj a přípravu nového energetického nápoje. Teoretická část práce se zaměřuje na srovnání na trhu dostupných energetických nápojů, představení hlavních aktivních složek a návrh obohacení nového energetického nápoje. Rovněž popisuje možnost využití enkapsulace a metody použité ke stanovení.

V experimentální části práce byla nejprve provedena charakterizace energetických nápojů z hlediska obsahu kofeinu, cukru, polyfenolu a vitamínu C. Dále byl navržen vlastní energetický nápoj, jehož základ tvořily vybrané druhy sypaných čajů, které byly obohaceny o enkapsulovaný extrakt acai, aceroly, macy, goji a ženšenu.

Všechny extrakty obsahovaly velké množství polyfenolu a antioxidačně aktivních látek. Extrakty aceroly navíc obsahovaly velmi vysoké množství vitamínu C. Pro enkapsulaci byly připraveny dva typy částic, alginátové částice a liposomy. Pro všechny částice byla stanovena enkapsulační účinnost, velikost, stabilita i antioxidační aktivita. Poté byla v rámci tří měsíců sledována dlouhodobá stabilita. Částice byly také vystaveny působení umělé žaludeční, pankreatické a žlučové šťávy. Všechny testované částice vykazovaly velmi dobrou enkapsulační účinnosti. Z hlediska dlouhodobé stability při skladování ve vodném prostředí vyhovovaly především liposomové částice, které vykazovaly rovněž vysokou stabilitu měřením zeta potenciálu. U alginátových částic docházelo naopak při skladování ve vodném prostředí k uvolňování aktivních látek. Na závěr byl vytvořen energetický nápoj a podroben senzorické analýze. Jako nejlepší byl vyhodnocen energetický nápoj se základem z černého či zeleného čaje s alginátovými částicemi acai, goji či ženšenu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Energetické nápoje, enkapsulace, alginát, liposomy, polyfenoly, kofein, antioxidační aktivita

ABSTRACT

The aim of this thesis is the development and preparation of a new energy drink. The theoretical part of the thesis focuses on the comparison of the drinks available in market, the presentation of the main active ingredients and the proposal of enriching the new energy drink. It also describes the possibility of using an encapsulation and the method used to determine specific compound in energy drink or encapsulated particles.

In the experimental part of the work, at the beginning, the main content of energy drinks were characterized, for instance caffeine, sugar, polyphenol and vitamin C. Subsequently the energy drink based on selected types of loose teas that were enriched with the encapsulated extract of acai, acerola, maca, goji and ginseng was designed.

All extracts contained large amounts of polyphenols and antioxidants. In addition, acerola extracts contained very high amounts of vitamin C. Two types of particles, alginate particles and liposomes were prepared for encapsulation. For all particles, encapsulation efficiency, size, stability, and antioxidant activity were determined. Long-term stability was then monitored within three months. The particles were also exposed to artificial gastric, pancreatic and bile juice. All tested particles showed very good encapsulation efficiency. In terms of long-term storage stability in an aqueous environment.

Particularly liposome particles, which also showed high stability by zeta potential measurement, were suitable. On the contrary, in case of alginate particles, when stored in an aqueous medium, the release of active substances occurred. Finally, an energy drink was created and subjected to sensory analysis. The best energy drink was based on black or green tea with alginate particles acai, goji and ginseng.

KEY WORDS

Energy drinks, encapsulation, alginate, liposomes, polyphenols, caffeine, antioxidant activity

VYSOKÁ, M. *Vývoj energetických nápojů nového typu s obsahem přírodních aktivních složek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 80 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petra Matouškové, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucí práce a děkana FCH VUT.

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé práce Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a vstřícnost při zpracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala své konzultantce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za možnost konzultace výsledků při zpracování experimentální části. Velké díky patří také mé kamarádce Ing. Daně Byrtusové za podporu během psaní mé diplomové práce.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Definice energetického nápoje	10
2.2	Toxikologicky významné či jinak rizikové komponenty energetických nápojů	10
2.3	Složení energetických nápojů	10
2.3.1	Kofein	10
2.3.2	Taurin	12
2.3.3	Inozitol	14
2.3.4	L-karnitin	14
2.3.5	Vitamin C	15
2.4	Sacharidická a umělá nekalorická sladidla v energetických drincích	15
2.4.1	Sacharidická sladidla	16
2.4.2	Umělá nekalorická sladidla	16
2.5	Barviva a konzervanty v energetických nápojích	17
2.6	Látky s přidanou hodnotou	17
2.6.1	Antioxidanty	17
2.6.2	Flavonoidy	18
2.6.3	Polyfenoly	19
2.6.4	Fosfolipidy	20
2.6.5	Acai Berry	20
2.6.6	Acerola	20
2.6.7	Maca	21
2.6.8	Goji	21
2.6.9	Ženšen	22
2.6.10	Yerba Maté	22
2.7	Složení vybraných energetických nápojů	22
2.8	Enkapsulace	24
2.8.1	Materiály pro enkapsulaci	24
2.8.2	Využití enkapsulace v energetických nápojích	24
2.8.3	Polysacharidy	25
2.8.4	Alginát	25
2.8.5	Chitosan	26
2.8.6	Liposomy	26
2.8.7	Druhy příprav lipidů	27
2.8.8	Otevírání liposomů	27
2.9	Metody využívané k analýze částic a enkapsulovaných látek	27
2.9.1	Spektrofotometrie	27

2.9.2	Dynamický rozptyl světla	27
2.9.3	Stanovení stability částic pomocí analýzy zeta potenciálu	28
2.10	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	29
3	CÍL PRÁCE	30
4	PRAKTICKÁ ČÁST	31
4.1	Použité chemikálie	31
4.1.1	Použité standardy	31
4.1.2	Chemikálie použité na spektrofotometrické stanovení	31
4.2	Přístroje a pomůcky	31
4.3	Vzorky	32
4.3.1	Bylinné extrakty	32
4.3.2	Čajové základy	33
4.3.3	Energetické nápoje	33
4.4	Příprava vzorků	33
4.4.1	Bylinné extrakty	33
4.4.2	Čajové základy	33
4.5	Chromatografické metody	34
4.5.1	Stanovení kofeinu metodou HPLC s UV-VIS detekcí	34
4.5.2	Stanovení Vitaminu C metodou HPLC s UV-VIS detekcí	34
4.5.3	Stanovení množství sacharidu metodou HPLC s RI detekcí	34
4.6	Spektrofotometrické metody	34
4.6.1	Stanovení celkových polyfenolů	34
4.6.2	Stanovení celkových flavonoidů	34
4.6.3	Stanovení antioxidační aktivity	35
4.7	Příprava částic	35
4.7.1	Příprava alginátových částic	35
4.7.2	Příprava liposomů	35
4.8	Stanovení enkapsulační účinnosti	35
4.9	Stanovení velikosti a distribuce částic pomocí DLS	36
4.10	Stanovení stability částic pomocí zeta potenciálu.	36
4.11	Sledování dlouhodobé stability částic	36
4.12	Stabilita částic v modelovém fyziologickém prostředí	36
4.12.1	Žaludeční šťáva	36
4.12.2	Pankreatická a žlučová šťáva	36
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	37
5.1	Charakterizace Energetických drinků	37
5.1.1	Stanovení kofeinu metodou HPLC s UV-VIS detekcí	37

5.1.2	Stanovení množství sacharidu metodou HPLC s RI detekcí	38
5.1.3	Stanovení vitamínu C metodou HPLC s UV-VIS detekcí	39
5.1.4	Stanovení obsahu polyfenolyckých složek	39
5.2	Návrh energetického nápoje a jeho charakterizace	39
5.2.1	Základ energetického nápoje	39
5.2.2	Obohacení energetického nápoje	43
5.2.3	Enkapsulace aktivních látek	45
5.2.4	Návrh energetického nápoje	56
5.3	Senzorická analýza	57
5.3.1	Senzorické zhodnocení základu drinku	59
5.3.2	Senzorické zhodnocení připravených alginátových částic	60
5.3.3	Senzorické zhodnocení připravených kombinací částic se zvoleným základem	61
5.4	Finální obohacený energetický nápoj	65
6	ZÁVĚR	67
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	74
9	PŘÍLOHY	75
9.1	Kalibrační křivky	75
9.2	Chromatogram	78
9.3	Dotazník pro senzorické hodnocení nového typu energy drinku	79

1 ÚVOD

Příčinou vzniku energetických nápojů byla snaha pomoci lidem při překonání únavy či povzbuzení v krizové situaci. Mezi nejčastěji používané a současně hlavní ingredience patří kofein a sacharidy. Tyto látky jsou tedy v drincích obsaženy z důvodu dodání energie a podpoření stavu okamžité bdělosti. Z dlouhodobého hlediska však může dojít naopak k oslabení energie v důsledku stresu a únavy nadledvin.

Všudypřítomné reklamy na sociálních sítích či na samotných etiketách výrobků slibují, že v člověku vzbudí energii, vybičují jej k lepším výkonům. Snad právě z tohoto důvodu popularita energetických nápojů neustále roste, stejně jako počet jejich druhů. V roce 2006 vydělaly svým výrobcům 3,5 miliardy dolarů, následující rok již 4,7 miliardy a v současné době je tato částka odhadována na více než 10 miliard dolarů. Původním zamýšleným konzumentem energetických nápojů měla být komunita vrcholových sportovců a rekonvalescentů. Nyní však jsou energetické nápoje předmětem běžné konzumace velké části populace. Největší oblíbenosti se těší u teenagerů a žáků základních škol, kde se popíjení těchto nápojů stalo novým fenoménem. Většina lidí je v podstatě vnímá jako kterýkoliv jiný nápoj. V tomto přesvědčení je utvrzují i sami výrobci těchto nápojů, kteří zdůrazňují pouze jejich pozitiva. Naproti tomu lékaři zdůrazňují, že energetické nápoje se nehodí k časté a pravidelné konzumaci, pro některé skupiny obyvatelstva jsou nevhodné až nebezpečné a mohou vážně poškodit zdraví. Mezi laickou veřejností kolují o prospěšnosti či naopak nebezpečnosti energetických nápojů značně rozporné informace.

Už jenom cukr sám o sobě ze všech dalších možných zdravotních rizik může způsobit cukrovku, což je nemoc, která dosáhla v USA epidemiologických rozměrů právě kvůli velkému množství cukru. Nakonec může přemoci i slinivku břišní, orgán, který vytváří inzulin pro vyrovnaní hladiny cukru. Energetické nápoje tak přispívají k riziku opotřebování slinivky břišní. Zatímco malé množství kofeinu není obecně považováno za nebezpečné, větší množství může přespříliš stimulovat náš centrální nervový systém a může nebezpečně zvyšovat krevní tlak a srdeční frekvenci. Kofein je také návykový, jeho abstinenční příznaky zahrnují bolesti hlavy a podrážděnost. Kofein má též na svědomí ztrátu cenného vitamínu B, který je potřebný pro „normální“ tvorbu energie.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Definice energetického nápoje

V současné době neexistuje jedna jediná správná definice energetického nápoje. Vedou se jednání, která by definovala, co je a co není energetický nápoj. V rámci Evropské unie například Německo navrhuje předpis, který by měl v Evropské unii regulovat energetické nápoje na základě legislativy o ovocných šťávách. V tomto návrhu je energetický nápoj definován jako nápoj obsahující kofein a alespoň jednu z dalších složek: taurin, inozitol či glukuronolakton. Kromě limitu pro kofein (320 mg/l) je stanoven i limit pro taurin (4 000 mg/l), pro inozitol (200 mg/l) a pro glukuronolakton (2 400 mg/l). Dalším požadavkem je, že energetický nápoj nesmí na rozdíl od časté dosavadní reality obsahovat alkohol. Na každém energetickém nápoji by mělo být uvedeno varování, že nemá být kombinován s alkoholem ani s fyzickým cvičením. Varování před kombinací s alkoholem je dosud uváděno jen na dobrovolné bázi. Nové návrhy bezpochyby rozproudí diskusi na téma bezpečnosti energetických nápojů. Dosud byly občasné dotazy na bezpečnost odbývány poukazem na stanoviska agentury EFSA (European Food Safety Authority) k jednotlivým obsaženým složkám [1].

2.2 Toxikologicky významné či jinak rizikové komponenty energetických nápojů

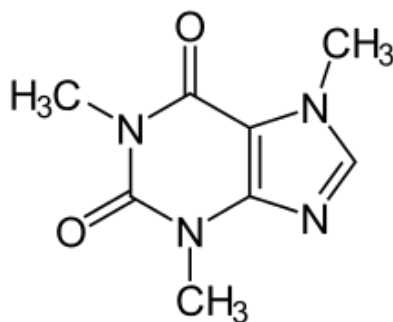
Řada chemických látek obsažených v energetických nápojích nemusí být pro konzumenta jednoznačně užitečná, ale mohou sebou nést i zdravotní rizika. Mohou to být i hlavní složky jako je kofein, taurin, inozitol, karnitin či glukuronolakton. V určitých situacích mohou být považovány za rizikové látky také cukry či umělá sladidla, barviva a konzervanty, ale také i některé rostlinné extrakty [2].

2.3 Složení energetických nápojů

Hlavní hybnou silou růstu v oblasti energetických nápojů mezi dospělými je jejich schopnost zvýšit duševní bdělost, zlepšit fyzickou výkonnost a dodávka energie. Nicméně, doprovázející exponenciální růst užívání energetických nápojů vyvolává otázky týkající se bezpečnosti a nepříznivých vlivů, zejména na kardiovaskulární a centrální nervový systém. Je proto důležité znát složení jednotlivých energetických nápojů před zakoupením a být obeznámen s tím co jednotlivé složky mohou v kombinaci s ostatními způsobovat [3][4].

2.3.1 Kofein

Kofein se vyskytuje ve formě bílé krystalické látky s hořkou chutí. Chemicky se jedná o purinový derivát 1,3,7-trimetylxantin (*Obrázek 1*). Do skupiny metylyxantinů řadíme také teobromin a teofylin. V plodech a listech rostlin je kofein obsažen z důvodu ochrany před hmyzem, který se živí různými částmi dané rostliny, kofein zde hraje roli přírodního pesticidu [5].



Obrázek 1: Strukturní vzorec kofeinu

Čas setrvání kofeinu v těle člověka (biologický poločas) se pohybuje mezi 3 až 10 hodinami, přičemž nejvíce působí během prvních 30–60 minut a jeho stimulační účinky (*Tabulka 1*) mohou být pozorovány již 10 minut po spotřebování [5].

Tabulka 1: Vliv různého množství kofeinu na lidský organismus

Množství [mg]	Vliv na organismus
20–400	Zvýšení energie, koncentrace, člověk se lépe cítí, zvyšuje se jeho výkonnost, snižuje se pocit únavy a ospalosti – celkový efekt se tedy dá popsat jako příjemný. Taktéž se zlepšuje peristaltika střev, mírně se zvyšuje krevní tlak [2].
400–800	Nervozita, podrážděnost, červené tváře, třas rukou a cukání svalstva, hyperaktivita, poruchy spánku. U žen, které konzumují více než 400 mg kofeinu denně, se může zvýšit riziko močové inkontinence [1] [6].
1000 a více	Může vést ke zvýšené hladině cholesterolu, dehydrataci organismu, nedostatku vitaminů B a C, zinku, draslíku a thiaminu, zvýšenému krevnímu tlaku a srdečním potížím, problémům s prostatou u mužů a fibrocystickými změnami v prsní žláze u žen, interferencím při replikaci DNA a také může bránit správnému vstřebávání železa[1].

a) Farmakokinetika a biotransformace kofeinu

Kofein je rychle a kompletně absorbován z gastrointestinálního traktu (GIT), maxima v krvi je dosaženo během 30–45 minut (obvyklé koncentrace jsou 50 μM) a jeho průměrný poločas eliminace činí 4 hodiny, ale pohybuje se v poměrně širokém rozmezí 2,5 až 10 hodin. Delší je např. v těhotenství. Prostřednictvím tělesných tekutin se v těle dále distribuuje a následně metabolizuje a vylučuje močí. Na metabolizaci kofeinu u člověka se zejména podílejí jaterní cytochromoxygenázový systém P450, izoenzymy CYP1A2, CYP2A6 a dále N-acetyltransferáza a xanthinoxidáza. V moči bylo až dosud nalezeno 17 metabolitů, jejichž vzájemné zastoupení je závislé na fenotypu. Významnými metabolity jsou 1-methylxanthin, 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil, 1-methylurát a 1,7-dimethylurát [7][8][10].

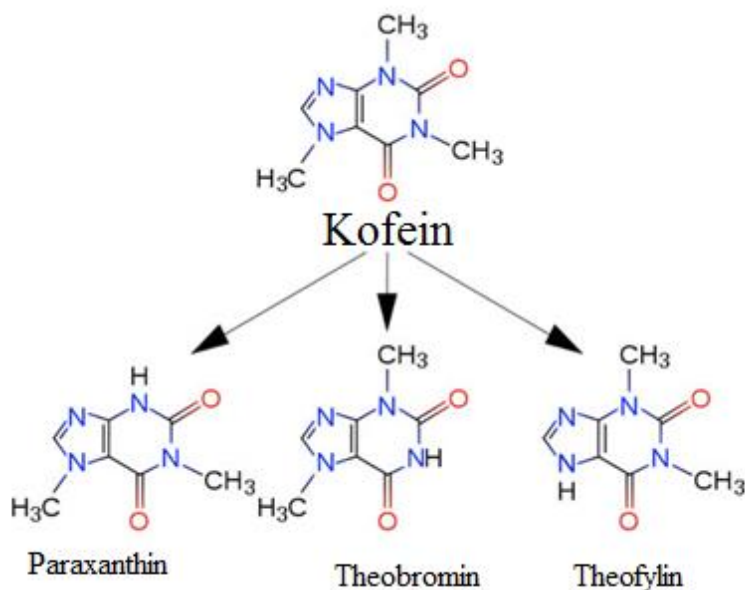
b) Farmakodynamika a mechanismus účinku kofeinu

Kofein se projevuje rovněž dalšími okamžitými účinky. Stimuluje uvolňování kortisonu a adrenalinu, což zvyšuje tlak krve a vyvolává zrychlenou frekvenci srdce. Na EKG je možno

pozorovat sinusovou a ventrikulární tachykardii a ventrikulární fibrilace. Po několik desetiletí byla konzumace kofeinu považována za příčinu hypertenze, ale nedávné klinické a laboratorní studie prokázaly, že běžné množství kávy nemá na vznik hypertenze žádný vliv. Přesto však byl tento účinek pozorován ve více případech u osob, které kávu pravidelně nepijí, převážně u mladých jedinců. Ačkoliv přiměřená konzumace kávy není většinou spojována se srdečními potížemi, je obtížné vyloučit všechny souvislosti týkající se její zvýšené konzumace. Jednou z nejčastěji diskutovaných otázek týkajících se konzumace kofeinu je, zda může u člověka vzniknout psychická nebo fyzická závislost na kávě. Náhlé přerušení konzumace kávy může vést i k abstinčním příznakům u lidí, kteří jsou zvyklí pít silnou kávu, např. neklid, únava, podrážděnost, silné bolesti hlavy apod. Může také spustit migrénu [7][9][10].

c) *Kofein z biochemického hlediska*

Kofein patří mezi purinové alkaloidy, kofein se z ústní dutiny dostane do žaludku, kde pronikne žaludeční a střevní stěnou do krevních vlásečnic a s krví pak pronikne dál do těla. Poločas rozpadu molekuly kofeinu v lidském těle je přibližně 5 hodin, může být však ovlivněn věkem či zdravotním stavem. Kofein se metabolizuje v játrech a odbourává na theofylin (4 %), theobromin (12 %) a paraxanthin (84 %) [5].

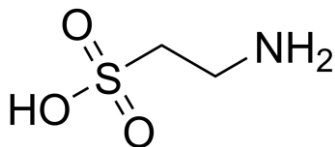


Obrázek 2:Metabolity kofeinu[7]

Mezi dvě nejzásadnější metabolické cesty kofeinu patří: inhibice fosfodiesterázy a antagonismus adenosinových receptorů. Kofein inhibuje fosfodiesterázu (enzym katalyzující hydrolýzu cyklického AMP), čímž se zvýší koncentrace cAMP v těle. Následkem toho dojde ke zvýšené lipolýze, což se projeví zvýšením plazmatických glycerolu a volných mastných kyselin. Dochází také ke zvýšenému uvolnění katecholaminů. Kofein se také může nespecificky vázat na adenosinové receptory čímž zamezí vazbě adenosinu na receptory a je snížen pocit únavy v mozku a člověk má tak nabuzen organismus k delšímu výkonu[4][7].

2.3.2 Taurin

Taurin je často zařazován mezi aminokyseliny, přestože neobsahuje karboxylovou skupinu. Chemicky se jedná o 1-aminoethan-2-sulfonovou kyselinu (*Obrázek 3*). Taurin je jedinou přirozeně se vyskytující aminosulfonovou kyselinou, která je zatím známa [4].



Obrázek 3: Strukturní vzorec taurinu[4]

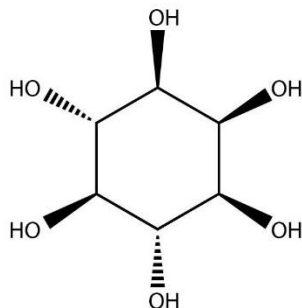
Taurin je zapojen do několika důležitých fyziologických funkcí, včetně osmoregulace, protizánětlivé aktivity, antioxidační aktivity, údržby normální mitochondriální funkce a syntézy ATP. Buněčné vyčerpání taurinu je spojováno s vývojovými vadami, ztrátou imunity, oslabeným buněčným růstem, poškozením sítnice a s rozvojem kardiomyopatie. Mnohé z těchto poznatků vedly k využití taurinu v potravinových doplňcích, kojeneckých výživách či energetických nápojích a nápojích určených pro vrcholové sportovce. Taurin je jednou z hlavních volných „aminokyselin“ v centrálním nervovém systému. V poměrně velkém množství je obsažen v retině, a také ve svalstvu a plicích. Důležitou roli hraje taurin při regulaci buněčného objemu, agregaci trombocytů, jako antioxidant a jako neurotransmitter a stabilizátor buněčných membrán. Nízké hladiny taurinu se vyvíjejí u těžkých katabolických stavů, jako jsou nádorová onemocnění, zejména při akutních komplikacích, po operacích a traumatech, popáleních, při chemoterapii a ozařování. V katabolických stavech je snížena aktivita enzymu cysteindekarboxylázy, která rozhoduje o rychlosti syntézy taurinu. Glykoregulaci a metabolickou kontrolu ovlivňuje efektem vazby na inzulin a inzulinové receptory. Dostatečný přívod taurinu, případně jeho zvýšení do farmakologických dávek, vede ke snížení plazmatických koncentrací lipidů, zejména u nemocných s inzulinorezistencí, obézních a diabetických pacientů. Farmakologický efekt taurinu se projevuje při dávkách 3 a více gramů za den [3].

Taurin se vyskytuje v poměrně vysoké koncentraci v betabuňkách Langerhansových ostrůvků a má schopnost normalizovat sekreci inzulinu u buněk porušených cytosiny. Příznivé účinky taurinu se využívají i v transplantační medicíně, a to díky dlouhodobé ochraně orgánů. Podrobně byl taurin sledován ve vztahu k jaterním funkcím, při chronické hepatitidě, poškození jater toxiny a jaterní fibróze. K výrazné destrukci tkáně dochází až tehdy, když je kapacita regenerace hepatocytů zcela vyčerpána. Rovnováhu mezi regenerací hepatocytů a vazivovou tkání příznivě a ve prospěch zachování funkčních buněk zajišťuje taurin. Zejména poslední zkušenosti ukazují na významný protektivní efekt taurinu na integritu jaterní tkáně, která byla chemicky poškozena [4].

Taurin jako takový by měl v lidském těle tlumit výskyt nežádoucích účinků vyvolaných přebytkem kofeinu. Byl testován vliv kofeinu a taurinu na kardiovaskulární systém. Byly porovnávány nápoje, přičemž jeden obsahoval placebo, druhý pouze kofein a třetí kofein s taurinem. Výsledky ukázaly, že po podání taurinu a kofeinu má vliv na stahy levé srdeční komory. Což dokládá fakt, že taurin v kombinaci s kofeinem snížil tepovou frekvenci a sportovci jsou schopni podat lepší výkon při dlouhodobém cvičení [11].

2.3.3 Inozitol

V živých organismech se molekula inozitolu (*Obrázek 4*) vyskytuje nejčastěji jako součást komplexu vitaminu B, ve formě fosfátových esterů, z nichž mnohé jsou významnými signálními molekulami v buňce. Z těch nejvýznamnějších jsou to inozitol-1-fosfát, inozitol-1,4,5 -trifosfát a inozitol-1,2,3,4,5,6 -hexakisfosfát, známý též jako kyselina fytová [13].



Obrázek 4: Strukturní vzorec inozitolu [13]

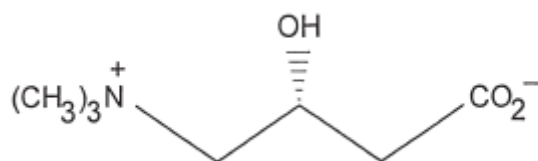
Inozitol je látka, kterou si tělo neumí v dostatečném množství samo vytvořit a musí ji přijímat v potravě. Má tedy charakter vitaminu. Jen v menších množstvích se tvoří u člověka pomocí střevních bakterií. Ve větších množstvích se inozitol nachází v rostlinných potravinách, zejména v zelenině, ovoci, celozrnných potravinách, ale také v masu a mléce. V organismu je především v buněčných membránách mozku, myokardu a kosterní svalovině, obvykle ve spojení s lipidy ve formě fosfatidylinozitolu [12].

Příjem inozitolu ve formě potravy nemusí být pro tělo dostatečný. Předpokládá se, že pravidelný příjem inozitolu spolu s lecitinem pomáhá v boji proti civilizačním chorobám. Má pozitivní účinky na mozkovou činnost a prospívá svalům. V ČR je inozitol registrován jako potravinový doplněk, obvykle však není distribuován samostatně, ale společně s lecitinem. V energetických nápojích je obvykle 50 mg inozitolu na 250 ml nápoje [13].

V intermediárním metabolismu se uplatňuje především jako transportní systém pro mastné kyseliny a cholesterol, podílí se také na eliminaci volných kyslíkových radikálů. Podílí se na snížení hladiny nežádoucího LDL cholesterolu a zvyšuje hladinu potřebného HDL cholesterolu. To má význam pro prevenci aterosklerózy, obezity i ochranu jater před jejich tukovou degenerací [14].

2.3.4 L-karnitin

Jedná se o aminokyselinu účastnící se β -oxidace mastných kyselin. Technicky vzato se karnitin nepovažuje za vitamin ale jako vitamin slouží pro srdeční svalstvo.

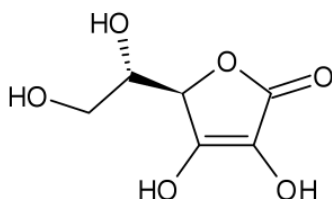


Obrázek 5: Strukturní vzorec karnitinu [13]

Své použití nachází jako podpůrný léčebný prostředek při vrozených či získaných avitaminózách, při konečných fázích renálních onemocnění anebo při demenci. Dále pomáhá zvyšovat pozornost a snižuje hyperaktivitu u jistých skupin dětí. Ve vysokých dávkách může způsobit zvracení, bolesti břicha a průjem. L-karnitin je jednou ze složek obsažených v energetických nápojích, kde by měl zvyšovat odbourávání tuků a urychlit tak jejich spalování. L-karnitin je hojně využíván ve fitness doplncích [15].

2.3.5 Vitamin C

V přírodě se vyskytují 4 stereoizomery kyseliny askorbové, ale pouze jeden vykazuje aktivitu pro vitamin C, a to kyselina 2-keto-L-gulonová (*Obrázek 6*), též L-askorbová [16].



Obrázek 6: Strukturní vzorec vitaminu C [16]

Kyselina askorbová je syntetizována všemi zelenými rostlinami, které zajišťují svoji energii pomocí fotosyntézy. Schopnost vyrobit si kyselinu askorbovou má i většina živočichů, ale pouze pro některé savce včetně člověka se jedná o vitamin. Podílí se především na významných hydroxylačních reakcích probíhajících v organismu. Uplatňuje se v metabolismu cholesterolu, drog a v řadě dalších reakcí. Při dlouhodobém nedostatku kyseliny askorbové v potravine dochází k manifestaci avitaminózy formou kurdějí. Dále nastává kapilární krvácení, špatný růst osteoblastů, fibroblastů, snížená syntéza kolagenu. Při běžné konzumaci potravin ve vyspělých zemích nedochází k podobnému nedostatku vitaminu C v těle. Hypovitaminóza u kyseliny askorbové bývá zaznamenána v případě lidí s nízkými finančními příjmy, špatnou životosprávou, u starších osob, chronicky nemocných jedinců, alkoholiků a lidí s psychickou poruchou. Zdravotní účinky vitaminu C na snížení tvorby modřin a otoků dolních končetin pozorujeme již během prvního týdne při dávce 1 g na den. Velmi důležitými reakcemi souvisejícími s antioxidačními vlastnostmi vitaminu jsou reakce s aktivními formami kyslíku, resp. S volnými radikály, a reakce s oxidovanými formami vitaminu E. Askorbát existuje přirozeně ve dvou redoxních stavech, jako stabilnější a fyziologicky aktivní forma kyselina askorbová a pouze 5 % zastoupení kyseliny dihydroaskorbové, která se může v lidském těle redukcí přeměnit na zpět na kyselinu askorbovou [16][17].

2.4 Sacharidická a umělá nekalorická sladidla v energetických drincích

Sacharidy se v energetických nápojích nacházejí nejen z důvodu energetického obsahu, ale také pro získání potřebné sladké chuti, která z něj činí chutný nápoj. Lidé obecně lépe přijímají sladkou chuť nápojů než hořkou či trpkou, obecně je sladká chuť spojována s příjemným pocitem a uspokojením. Sacharidy však mohou být nahrazeny také umělými či přírodními sladidly [18].

a) Biochemická přeměna sacharidů v těle

Heterotrofní organismy získávají energii pro endergonické reakce oxidací hlavních živin, mezi které patří sacharidy. Odhaduje se, že asi 75 % příjmu energie zajišťované sacharidy poskytují polysacharidy a 25 % oligosacharidy a monosacharidy. Cukry získávané potravou podléhají při přeměně v organismu mnoha reakcím. V tenkém střevě se řada cukrů vstřebává (resorbuje) aktivně (glukosa a galaktosa ve formě fosforečných esterů) nebo difuzí (ostatní monosacharidy) do tělních tekutin. Jsou transportovány do jater, kde jsou transformovány na glukosu, která je klíčovou sloučeninou metabolismu a zdrojem energie u živočichů i rostlin. Oxidací glukosy vznikají jednoduché organické sloučeniny, konečnými produkty oxidace jsou oxid uhličitý a voda. Přebytek glukosy se skladuje v játrech a ve svalech jako glykogen. Glukosa se přeměňuje na molekuly kyseliny pyrohroznové při procesu zvaném glykolýza, která probíhá v cytoplasmě buněk u všech živých organismů. Čistým výtěžkem glykolýzy z 1 molekuly glukosy jsou 2 molekuly adenosintrifosfátu ATP a 2 molekuly kyseliny pyrohroznové. Ta se dále přeměňuje na acetylkoenzym A, jež dále vstupuje do Krebsova cyklu (společné metabolické dráhy sacharidů, lipidů a proteinů), který je přímo spojen s dýchacím řetězcem. Dále jsou získány 2 molekuly redukovaného koenzymu NADH [12].

2.4.1 Sacharidická sladidla

Sacharidická sladidla jsou získávána z přírodních zdrojů. Jedná se o přírodní cukry jako sacharóza nebo o sladké látky, které lze vyrobit přeměnou cukrů použitím enzymů, hydrogenace nebo jiných chemických reakcí. Sacharidická sladidla jsou v organismu bohatým zdrojem energie. V energetických nápojích lze nejčastěji nalézt tyto cukry [19]:

- Sacharóza
- Fruktóza
- Fruktózové sirupy
- Sorbitol
- Xylitol
- Sukralóza

2.4.2 Umělá nekalorická sladidla

Pod označením umělá sladidla se schovávají synteticky připravené látky sladké chuti, které samy o sobě neobsahují téměř žádnou energii, nezvyšují hladinu krevního cukru a jejich jediným cílem je zpříjemnit chuť potravin. Takové látky jsou označovány jako nekalorická sladidla, obvykle mají mnohonásobně vyšší sladivost než sacharóza a jsou vhodné pro diabetiky a obézní osoby. Existují, však jisté studie které zpochybňují jejich zdravotní nezávadnost. Nejčastěji byla tato umělá sladidla podezřívána, že mohou vyvolávat rakovinu. Nejnovější studie však tyto spekulace nepotvrdily. Je však velice důležité aby konzumenti nepřekročili doporučené denní dávky, protože nemůžeme zcela vyloučit či potvrdit jejich nulové nebezpečí. Do energetických nápojů se nejčastěji přidávají [20]:

- Sacharin
- Acesulfam draselný
- Aspartam

2.5 Barviva a konzervanty v energetických nápojích

Barviva se v potravinářském průmyslu používají z estetických důvodů. Zákon č. 110/1997 Sb. definuje potravinářská barviva jako látky, jež udělují potravině barvu, kterou by bez jejich použití neměla, nebo které rekonstruují barvu, jež byla poškozena či zeslabena během technologického procesu [21].

Potravinářská barviva se dělí na dvě skupiny: barviva přírodní (včetně přírodně identických) a barviva syntetická. Barviva přírodní jsou získávána z přírodních zdrojů rostlinných, živočišných i nerostných. Přírodně identická barviva jsou dnes sice většinou vyráběna synteticky, ale po chemické stránce jsou totožná s přírodními [22].

Konzervanty v potravinách jsou důležitými aditivy v mnoha potravinářských výrobcích, včetně energetických nápojů. Zákon č. 110/1997 Sb. definuje konzervanty jako látky, které prodlužují udržnost potravin a které je chrání proti zkáze způsobené činností mikroorganismů. Konzervanty tvoří necelé jedno procento z celkového množství používaných přídatných látek [21].

2.6 Látky s přidanou hodnotou

Stoupající incidence nádorových onemocnění spojená se zhoršujícími se podmínkami životního prostředí představuje závažný sociálně-ekonomický problém. Variabilita nádorového onemocnění v kombinaci s individualitou pacienta jsou i přes značné pokroky v úspěšnosti léčby stále významnými faktory ovlivňujícími terapeutickou úspěšnost těchto onemocnění. Proto jsou možnosti prevence vzniku nádorů intenzivně studovaným oborem řady lékařských oborů [23].

2.6.1 Antioxidanty

Antioxidanty jsou v našem těle přítomny hlavně z důvodu vyvážení negativního působení volných radikálů. Tyto látky mohou být buďto přímo syntetizovány v našem těle anebo přijímány potravou. Tyto látky jsou obsaženy v menší míře v našem těle než látky, které mají ochraňovat a zabránovat jejich oxidační destrukci [17].

V dnešní době se věnuje zvýšená pozornost antioxidantům přijímaným s potravou a to hlavně z hlediska jejich biologické účinnosti a snadné dostupnosti. Tyto látky jsou totiž považovány za faktory rekce či eliminace oxidačních agens. Cílem této aktivity je ochrana struktur a funkcí mnohých biomolekul (inhibují např. oxidaci polynenasycených mastných kyselin), udržování fyziologické rovnováhy mezi iniciátory oxidací, a systémem antioxidační ochrany organismu v průběhu oxidačního stresu, či stimulace tvorby a aktivity endogenních antioxidantů. Převaha volných radikálů nad antioxidanty se nazývá oxidační stres. Volné radikály jsou charakterizovány nepárovými elektrony. V přítomnosti kyslíku se na místo nepárového elektronu okamžitě naváže molekula kyslíku a vzniká peroxylový radikál, který se snaží získat z jiné sloučeniny chybějící elektron, čímž vytváří jiný volný radikál [9][12][23][24][25][26].

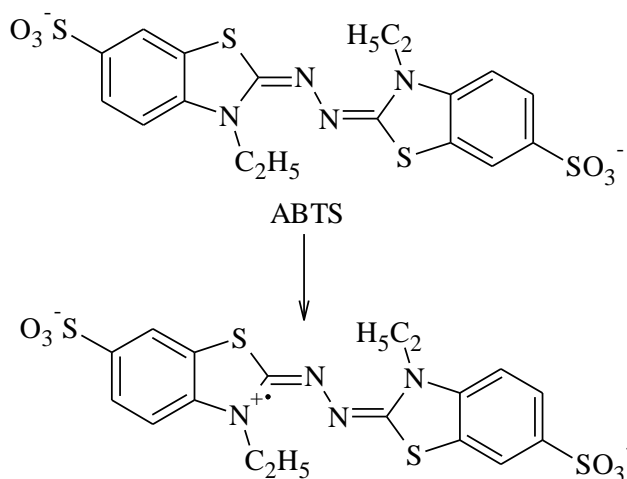
Dělení antioxidantů [26]:

- primární antioxidant (fenolické sloučeniny – tokoferoly aj.)
- sloučeniny reagující s kyslíkem přímo (kyselina askorbová)
- sekundární antioxidant, rozkládající hydroperoxidy ve stabilní produkty
- enzymatické antioxidanty
- chelatující a maskující činidla (kyselina citronová, aminokyseliny, EDTA)

Stanovení celkové antioxidační aktivity potravin

Celková antioxidační kapacita (TAA) je termín, který vystihuje souhrnnou koncentraci všech látek s antioxidačními účinky ve vzorku. Metody pro stanovení TAA bývají velmi rozmanité, což je dáno působením různých mechanismů nízkomolekulárních antioxidantů. Obecně mohou být rozděleny do dvou skupin: metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a metody posuzující redoxní vlastnosti látek [27].

V této práci byla použita metoda TEAC (metoda používající ABTS). Tato metoda je jednou z nejpoužívanějších metod pro stanovení celkové antioxidační kapacity. ABTS je peroxidázový substrát, který reakcí s peroxylovými radikály nebo jinými oxidanty vytváří v přítomnosti H_2O_2 metastabilní radikál kation $\text{ABTS}^{\cdot+}$, který je intenzivně zeleno-modře zbarven a může být sledován spektrofotometricky v rozmezí 600–750 nm. K hodnocení celkové antioxidační aktivity vzorků se využívá parametr TEAC, který označuje antioxidační aktivitu vzorku ekvivalentní definovanému množství syntetického derivátu Troloxu, což je analog vitamínu E rozpustný ve vodě. $\text{ABTS}^{\cdot+}$ v roztoku není ovlivňován iontovými silami a může být rozpuštěn jak ve vodě, tak v organickém rozpouštědle. Z tohoto důvodu můžeme změřit hydrofilní i lipofilní antioxidanty. Metoda stanovení TAA vzorků pomocí ABTS je jednoduchá, rychlá v provedení a má široké uplatnění [27].



Obrázek 7: Jednoelektronová oxidace ABTS [27]

2.6.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou velmi rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů. V současné době je známo více než 4 000 flavonoidních látek a stále jsou objevovány další. Flavonoidy jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu, tvořeného dvěma benzenovými jádry, spojenými heterocyklickým pyranem [26][28].

Běžně bývají substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami a jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace. Mezi hlavní skupiny flavonoidů ve výživě člověka patří flavanoly, flavanony, flavony, flavonoly, proantokyanidiny, kyanidiny a isoflavonoidy. Přírodní flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě O-glykosidů, obsahují tedy ve své molekule necukernou součást (aglykon) a cukernou složku. Flavonoidy jsou důležitou součástí antioxidačního systému, zabraňují peroxidaci lipidů, likvidují volné kyslíkové radikály, mohou vázat a inaktivovat některé prooxidační kovové ionty jako je železo či měď. Ukazuje se, že přírodní flavonoidy s popsanými vlastnostmi mohou účinně působit v prevenci chorob majících původ v oxidačním poškození biologických struktur (ateroskleróza, kardiovaskulární onemocnění). Vhodný způsob stravování a příjem potravin s vyšším obsahem flavonoidů by mohl při léčbě těchto chorob napomáhat. Tato cesta ke zvýšení příjmu antioxidantů je zřejmě vhodnější než podávání samotných antioxidačních preparátů jako vitamin C a E [26][28]

Stanovení obsahu flavonoidu

Metoda je založená na změně zbarvení reakční směsi za přítomnosti flavonoidů. Intenzita zbarvení je odvislá od koncentrace flavonoidů ve vzorku. Obsah je měřen spektrofotometricky při 510 nm a jako standard je používán rutin, případně katechin [29].

2.6.3 Polyfenoly

Polyfenolické sloučeniny jsou takové látky, které ve své molekule obsahují dvě a více hydroxylových skupin navázaných na aromatickém jádře. Jsou zastoupeny téměř ve všech rostlinách, kde plní rozličné funkce. Chrání rostliny před oxidačním stresem, UV zářením a patogeny, taniny chrání rostliny před požíráním býložravci, lignany tvoří mechanickou výztuhu rostlinného těla a jiné polyfenoly mohou fungovat jako signální molekuly. V lidském organismu vykazují polyfenolické sloučeniny širokou škálu biologických účinků. Různé protektivní účinky polyfenolů chránící před vznikem a rozvojem nádorového onemocnění byly prokázány v mnoha studiích na různých modelech *in vitro* i *in vivo*. Mechanismus účinku jednotlivých polyfenolů závisí ve většině případů na jejich chemické struktuře, která je velmi různorodá, a proto i možností, jakými polyfenoly chrání organismus před vznikem nádorů, je několik. Na základě množství protektivních vlastností a směsí polyfenolů zastoupených ve stravě, lze vyslovit domněnku, že jejich působení proti karcinogenezi má nejspíš komplexní charakter složený z příspěvků jednotlivých látek.

Mechanismus účinku polyfenolů jako inhibitorů angiogeneze je různý. Některé působí inhibičně na růst a dělení endotelu, zatímco jiné brání aktivaci receptorů růstovými signály, inhibují proteinkinázu C, brání migraci endoteliálních buněk nebo inhibují tvorbu angiogenních faktorů. Reliene a spol. se ve své studii zabývají nanoenkapsulací bioaktivních složek granátového jablka jako možnou prevencí rakoviny prsu. Granátová jablka obsahují mnoho polyfenolických látek s vysokou antioxidační aktivitou, volnými radikály, tříslovinou a vlákninou. Extrakt z granátového jablka, šťáva z granátových jablek či jednotlivé polyfenoly v ní obsažené vykazují protinádorové účinky *in vitro* a *in vivo* [22][24] [25][30][31][32][33].

a) Stanovení obsahu polyfenolu

Stanovení celkového obsahu fenolických látek v přírodních produktech se provádí nejběžněji spektrofotometricky s využitím Folin-Ciocalteuova činidla [29].

Jedná se o reprodukovatelnou a jednoduchou metodu. Metoda se zakládá na barevné reakci FolinCiocaltauova činidla s hydroxylovými skupinami látek v roztoku vzorku. Vzorek reaguje s Folin-Ciocaltauovým činidlem, čímž dochází ke vzniku modrého zbarvení. Intenzita modrého zbarvení je závislá na koncentraci polyfenolů přítomných ve vzorku. Obsah polyfenolů je následně zjišťován spektrofotometricky jako absorbance vzniklých roztoků při 750 nm. Jako standard se běžně používá kyselina gallová [29].

2.6.4 Fosfolipidy

Fosfolipidy jsou hlavní součástí biologických membrán, jejich společným znakem je fosfátový zbytek, který tvoří ester s hydrolytickou skupinou na C-3 glycerolu nebo acyls핑ozinu. Díky fosfátové skupině mají fosfolipidy při neutrálním pH nejméně jeden negativní náboj. Pro enkapsulaci bylinných extraktů do lipidu je pro nás nejdůležitější lecitin, který je pro tělo velice dobře stravitelný [16].

Lecitin je nejčastěji získáván ze sójových bobů a tento je komerčně i nejvíce propagován. Biologicky je však nejpřirozenější lecitin z vejce. Lecitiny mají poměrně komplikované molekuly lišící se v zastoupení mastných kyselin. Součástí molekuly lecitinů je dále glycerol, aktivovaná kyselina fosforečná a cholin [16][34].

Lecitin díky vysokému podílu esenciálních mastných kyselin dokáže v krevním oběhu rozpouštět škodlivý LDL cholesterol. Ten pak snadno projde i těmi nejtenčími cévami a nemá tendenci se v nich usazovat. Lecitin se používá také k prevenci a léčbě neurologických onemocnění, jakými je například Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba a senilní demence, zlepšuje kvalitu pokožky, nehtů a vlasů [16][34].

2.6.5 Acai Berry

Euterpe brazilská je druh palmy pocházející z tropické Ameriky. V Brazílii je známa jako *Açaí*. Již po staletí je dobře znám blahodárný vliv plodů palmy Acai. V několika posledních desetiletích prošly plody Acai množstvím klinických studií. Dnes tak proto můžeme přesvědčivě doložit, že Acai berry by měl do svého jídelníčku zahrnout každý, kdo hledá přírodní prostředek prevence civilizačních onemocnění, ale třeba i nadměrně rychlého stárnutí kůže. Neobvyklá kombinace antioxidantů, nasycených mastných kyselin, aminokyselin a dalších látek totiž společně přispívá k přirozenějšímu zpracování potravy, spalování tuků a celkově ekonomičtějšímu fungování našeho těla. Acai berry má navíc schopnost znatelně snižovat naši chuť k jídlu, ale zároveň umí nastartovat metabolismus člověka. Dokáže mu dodat energii, ale spolu s tím zároveň zpomaluje ukládání tělesného tuku. Za tyto schopnosti pak v případě Acai berry vděčíme zejména skutečnosti, že jednotlivé plody jsou až ze 40 % tvořeny vlákninou. Je dokázáno, že plody Acai jsou velkými pomocníky v prevenci proti rakovině prsu [35][36].

2.6.6 Acerola

Acerola, nebo také tropická třešně, pochází ze střední Ameriky a pěstuje se především v Brazílii. Tento až třímetrový teplomilný keř má oranžové až tmavě červené plody, které mají lehce nakyslou ovocnou chuť připomínající citróny. Tropická třešně se po své sklizni suší a zpracovává na jemný prášek obsahující přírodní vitamin C a další zdraví prospěšné látky (vitaminy A, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, E; minerály jako např. draslík, hořčík, zinek, vápník, železo, měď, fosfor; glukózu, fruktózu, sacharózu a další bioflavonoidy) [37].

Takto sušený extrakt je třeba z důvodu přirozených vlastností aceroly (její citlivosti na vzdušný kyslík a sklonům k hrudkovatelnosti) navázat na vhodný nosič, který by zajistil její dlouhodobou stabilitu, protože bez něj by se acerola v poměrně krátké době stala bezcennou. K tomu se používá maltodextrin, což je v našem případě škrob z pšenice. Maltodextrin má nižší glykemický index než jednoduché cukry, přidává se běžně např. do sunarů a výživ pro kojence. Pomaleji se vstřebává a díky tomu pozvolna dodává energii do organismu, což je výhodné pro střednědobou zátěž. I proto je doporučován jako prospěšný zdroj energie přírodního charakteru zejména sportovcům [37].

2.6.7 Maca

Maca neboli také peruánský ženšen pochází z peruánských And a používá se již od dob Inků jak pro výživové, tak pro lékařské účely. Maca je trubicovitá kořenová zelenina, která se po sklizni přírodně zpracovává (je jemně sušena za nízkých teplot a mleta) na prášek podobný mouce. Kořeny macy se vyskytují v různých velikostech, tvarech a barvách - tento prášek je směsí červených, žlutých a černých kořenů. Maca je bohatě obdařená esenciálními živinami, které poskytují výborný zdroj energie, podporují fyzický a duševní výkon a pomáhají udržet optimální výdrž a vitalitu [38].

Léčivé účinky peruánského ženšenu [38]:

- je zdrojem energie
- podporuje fyzický i duševní výkon
- pomáhá udržet optimální výdrž, pocity a vitalitu spolu s fyzickou i duševní pohodou
- napomáhá udržovat energii
- přirozeně přispívá ke zdravé sexuální funkci

2.6.8 Goji

Dle tradiční čínské medicíny je Goji neboli kustovnice čínská léčivá rostlina, jejíž plody se často používají spolu s ženšenem a dalšími adaptogeny na "vyvážení jin a jang." Bobule Goji rostou na stromech výšky 2–3 metry, mezi nejvýznamnější exportéry Goji patří Čína. Bobule mají velikost 2–3 cm, barvou a velikostí podobné našemu šípku, a sklízí se 2x ročně. Kromě silného antioxidačního účinku přináší také úlevu při únavě a vzpruhu pro naši imunitu. Zvlhčuje plíce, podporuje detoxikaci orgánů a zvyšuje chuť na sex. Krom toho také snižuje krevní tlak a pozitivně působí na zrak a paměť. Obsahuje i ochranné látky proti toxinům a složky používané při léčbě bolestí zad, kloubů nebo léčbě cukrovky [35][38].

Léčivé účinky kustovnice čínské [38]:

- antioxidant (polysacharidy a flavonoidy)
- vhodné pro těhotné ženy, zdroj kyseliny listové
- podporuje imunitu
- snižuje hladinu cholesterolu
- působí proti degeneraci nervové a mozkové soustavy
- chrání cévní systém
- přírodní stimulant, afrodiziakum
- podporuje kvalitu vlasů, nehtů a kostí

- podporuje trávení (díky obsahu vlákniny) a chuť k jídlu
- působí proti stárnutí buněk
- zdroj zeaxantinu (podporuje zdravé oči)
- podporuje ledviny a játra
- posiluje srdce
- prospívá kvalitě spánku

2.6.9 Ženšen

Ženšen korejský, někdy také uváděn jako ženšen pravý, který se v Číně, Koreji a Japonsku používá k léčebným účelům již po tisíciletí, je znám jako adaptogen a regenerační tonikum, široce používané v tradiční čínské medicíně (TCM) i západních bylinných přípravcích. Zlepšuje koncentraci, brání vyčerpání, posiluje bdělost a nepůsobí jako stimulující látky typu kofeinu nebo amfetaminů. Na rozdíl od těchto látek nezpůsobuje excitaci – vzrušivost (nervozitu) a nenarušuje spánek. Naopak je využíván v mnoha léčivech sloužících pro zlepšení kvality spánku. Zlepšuje syntézu proteinů a nukleových kyselin. Způsobuje rovnováhu organismu vhodnou regulací tělesných funkcí. Moderní odborníci čínské bylinné léčby podporují dávná doporučení týkající se denního používání ženšenu pro dosažení obnovy a udržení si zdraví, stejně jako pro dosažení dlouhověkosti. Zlepšuje pocit tělesné i duševní pohody a životní síly a zvyšuje jak duševní, tak fyzickou výkonnost. Ženšen lze používat jako pomoc při erektilní dysfunkci (podporuje libido a sexuální výkonnost). Používá se též při symptomech spojených s menopauzou [38][39].





2.6.10 Yerba Maté

Yerba maté jsou sušené a drcené lístky Cesmíny paraguajské, posvátné rostliny jihoamerických indiánů Guarani. Pěstuje se v nevelké oblasti Paraguaye, Argentiny a Brazílie. Pro své posilující a stimulační účinky se tento nápoj stal populární v celé oblasti Jižní Ameriky a postupně pronikl do USA, kde se stal oblíbeným mezi kovboji v jižních státech unie, pak do Evropy a dále do celého světa. Maté dodá nejen energii, ale zároveň obsahuje řadu látek prospívajících lidskému organismu. Je schopno nahradit jídlo, takže zahání pocit hladu. Obsahuje vitaminy A, B₁, B₂, B₃, B₅ a C. Z minerálů v něm můžeme najít vysoké množství vápníku, hořčíku, manganu, železa, selenu, draslíku, křemíku a fosforu. Mimo jiné maté disponuje velkým počtem aminokyselin (asi 15 druhů), stopovými prvky a antioxidanty. Pravidelné popíjení maté působí na celý lidský organismus posilujícím a omlazujícím efektem. Vliv Yerby maté na úpravu tělesné hmotnosti je při alespoň několikaměsíčním popíjení patrný [37].

2.7 Složení vybraných energetických nápojů

Byly vybrány energetické nápoje běžně dostupné v obchodech. Mezi sebou byly tyto energetické drinky porovnávány z hlediska složení a přidaných látek, které obohacují každý energetický nápoj o přidanou složku a měly by tak zvýšit jeho povzbudivý či jiný požadovaný efekt na lidské tělo. V následující tabulce je vždy uveden název nápoje, vzhled jeho obalu, tak jak je dostupný v obchodech a jeho složení, jak je uvedeno na obalu výrobku.

Tabulka 2: Složení vybraných energetických nápojů

Název	Vzhled	Složení uvedeno na obalu
Big energy Shock		Voda, cukr, jablečná, maracujová, mangová a pomerančová šťáva z koncentrátu, oxid uhličitý, kyselina citronová, taurin, glukuronolakton, kofein, konzervanty: sorbát draselný, benzoát sodný, stabilizátory: glycerolester borovicové pryskyřice, škrobový oktenyljantarán sodný, pectin, xanthanová guma, arabská guma, inositol, extrakt guarany a ženšenu, barviva: amoniakový karamel, beta-karoten
Crazy Wolf		Voda, cukr, regulátory kyselosti: kyselina citronová, citrát sodný, oxid uhličitý, taurin, aroma, kofein, riboflavin, inositol vitaminy: niacin, kyselina pantothenová, B ₆ , B ₁₂ .
Red Bull		Voda, sacharóza, glukóza, regulátor kyselosti (citrát sodný, uhličitany hořečnaté), oxid uhličitý, kyselina citronová, taurin, kofein, inositol, vitaminy: niacin, kyselina pantothenová, B ₆ , B ₁₂ , aroma, barviva: karamel, riboflavin.
Rockstar		Voda, cukr, dextróza, kyselina citronová, oxid uhličitý, taurin, aroma, citrát sodný, aroma: kofein, glukuronolakton, karamel, riboflavin, extrakt kořene ženšenu, extrakt semen guarany, inositol, vitaminy: niacin, kyselina pantothenová, vitamin B ₆ , B ₁₂ .
Semtex cactus		Glukozo-fruktozový sirup, cukr, oxid uhličitý, regulátory kyselosti: E 330, E 331, taurin, kofein, inositol, aromata, zahuštěná šťáva z opuncie, barviva: E 101, E 133; vitaminy: niacin, kyselina pantothenová, vitamin B ₆ ; antioxidant: E 300

2.8 Enkapsulace

Enkapsulace je definována jako obalení nebo zachycení kapek či pevných částic látky přírodním nebo syntetickým materiálem, přičemž velikost kapsulí bývá nejvýše několik milimetrů (při mikroenkapsulaci obvykle 100–600 μm). Je tedy možno enkapsulovat látky pevné, kapalné či plynné [40].

Termín bioenkapsulace vyjadřuje zachycení biologicky aktivních látek (nebo tkání) v polopropustné membráně. Enkapsulace se začala v biotechnologii a farmacii využívat v 60. letech 19. století. Nyní se využívá hojně i v potravinářství pro přenos bioaktivních molekul do potraviny. Enkapsulaci biologicky aktivních látek zamezíme jejímu rychlému rozpadu, reaktivitě s okolním prostředím, docílíme tak postupného uvolňování látky z obalu, můžeme zamaskovat nežádoucí vůni či chuť. Částice se tedy skládá z obalu a jádra. Obal neboli povlak částice má určitou životnost závislou na typu částic použitých pro enkapsulaci. Po uplynutí určité doby dojde k částečné degradaci obalu a enkapsulovaná látka se postupně uvolňuje do okolního prostředí. Velikost částic se pohybuje v rozmezí nanometrů až milimetrů [41].

Použití liposomů jako nosičů léčiv je dosud nejběžnějším způsobem jejich medicínského využití. Mohou sloužit jako zásobník léčiva pro řízené uvolňování nebo jako nosičový systém pro cílený transport enkapsulovaného léčiva do příslušných tkání a struktur. Léčiva z liposomálních přípravků snadněji pronikají do nitra cílových buněk díky vysokému obsahu fosfolipidů. Léčiva mají často nízkou stabilitu či rozpustnost. Uzavření léčiva do nanočástic lék ochrání po dobu transportu na místo účinku. Vzhledem k cílenému transportu léčiv je možné snížit dávky a ochránit tak tělo před nepříznivými účinky jejich působení. Hlavní cíl je dosažení dlouhodobého a trvalého uvolnění s minimální pravděpodobností předčasného rozrušení obalu. Obdobnou aplikaci nalezneme například v potravinářství při enkapsulaci vitaminů rozpouštějící se v hydrofobním prostředí, jako vitamin A, D, E, K, nebo β -karoten, které lze velmi dobře zapouzdřit do liposomů, většinou efektivněji ve srovnání s vitaminy rozpustnými ve vodě [40][41][42][43].

2.8.1 Materiály pro enkapsulaci

Materiály použitelné pro enkapsulaci v potravinářském průmyslu můžeme rozdělit do 3 kategorií: bílkovinné, lipidové a polysacharidové. Mezi lipidové materiály řadíme například fosfolipidy, v našem případě jsme použili lecitin, dále mohou být použity mastné kyseliny, vosky či glycerid. Z polysacharidů se hojně využívá alginát, který je vhodný i pro enkapsulaci rostlinných extraktů. Mezi bílkovinnými materiály nachází své uplatnění želatina, lepek či kasein [41].

2.8.2 Využití enkapsulace v energetických nápojích

Při požití běžného energetického drinku se do těla dostane okamžitě velké množství kofeinu, cukru a dalších přidaných složek. Cílem enkapsulace může být pozvolné uvolnění těchto látek, dále může být enkapsulace využita pro zachování biologické aktivity přidaných složek v podobě bylinných extraktů s blahodárnými účinky na náš organismus. Hlavním cílem enkapsulace bylinných extraktů je tedy jejich ochrana při průchodu trávicím traktem a jejich pozvolné uvolnění do organismu a s tím související dlouhodobější účinek. Velkou výhodou je také enkapsulace látek neatraktivní vůně či chuti [41][42][43].

Hlavním cílem je tedy zabránit fyzikální nebo chemické degradaci v průběhu skladování a doručit je na místo působení. Díky enkapsulovaným částicím bohatým na antioxidanty, polyfenoly, flavonoidy a jiné vitaminy může mít nově vytvořený energetický nápoj vysokou nutriční hodnotu. Většina vitaminů na vzduchu či světle snadno podléhá oxidaci a ztrácí tak svou účinnost. Vhodným řešením je enkapsulace těchto vitaminů do liposomů, které ochrání vitaminy a umožní jejich řízené uvolňování. Existuje mnoho nanoenkapsulačních technik, kterými se ve svém článku zabývá Ezhilarasi a spol., mezi které patří např. emulgace, koacervace, odpařování rozpouštědla a superkritické tekutiny pro potravinářské přísady. Rovněž popisují techniky sušení, jako je například sušení rozprašováním a sušení vymrazováním, které se využívají za účelem stabilizace nanočástic. Hee Ryung Shim a kol. se ve své práci zabývali nanoenkapsulací Acai Berry, která je jednou z našich vybraných nadstandardních přísad do energetického nápoje za účelem zvýšení antioxidační aktivity [42][44][45].

2.8.3 Polysacharidy

Mezi nejčastěji používané polysacharidy pro zapouzdření účinné látky v potravinářství, především s ohledem na jejich cenu, patří škrob, celulóza a jejich deriváty. Dále se často využívají různé rostlinné extrakty, mikrobiální či živočišné polysacharidy. Méně využívány jsou mořské či sójové polysacharidy. Polysacharidy obsahují ve své struktuře stovky až tisíce monosacharidových jednotek, které jsou navzájem propojeny glykosidickou vazbou. Mají obvykle volnou pouze jednu anomerní hydroxylovou skupinu na konci řetězce z důvodu pouze jednoho redukujícího konce. Nejčastěji polysacharidy dělíme na homopolysacharidy a heteropolysacharidy. Škrob a celulóza patří mezi nejběžnější homopolysacharidy. Polysacharidy vyskytující se v přírodě, jako například alginát, chitosan či škrob, jsou velice vhodné pro využití v oblasti medicíny jako nosiče léčiv. Díky hydrofilní povaze jsou schopny tvořit gel a jsou stabilní a netoxické. Jediná nevýhoda je jejich vysoká rozpustnost. V přírodě se polysacharidy vyskytují jak ve své volné či ve vázané formě. Využití polysacharidu k enkapsulaci za účelem pozvolného uvolňování se využívá už přes 20 let [16][46].

2.8.4 Alginát

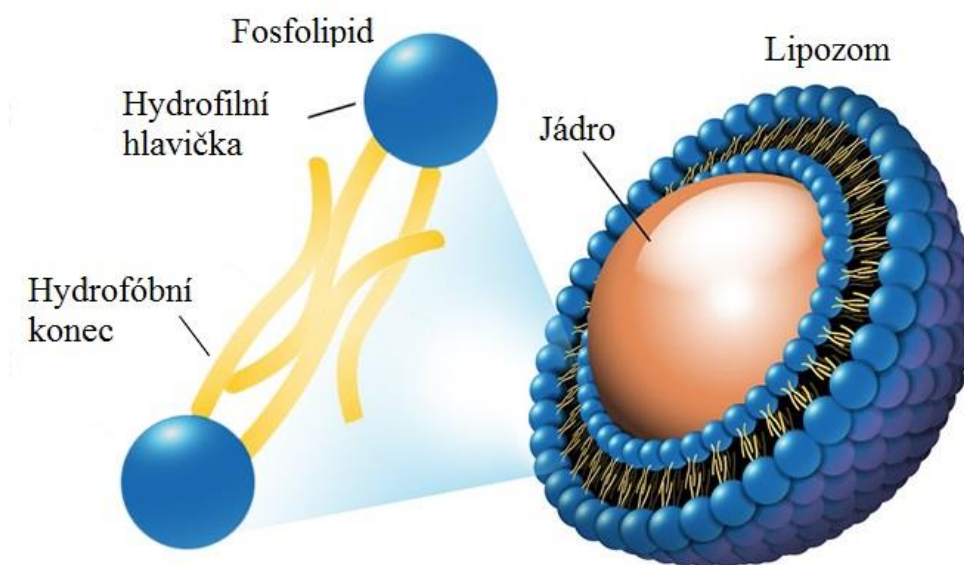
Alginát je ve vodě rozpustný lineární polysacharid, který se skládá ze zbytků α -L-gulonové a β -D-mannuronové kyseliny spojených 1-4 vazbami. Komerčně dostupný alginát je extrahován z hnědých mořských řas (*Phaeophyceae*), ale je možno ho získat rovněž produkcí bakteriemi (*Azobacter*, *Pseudomonas*). Je vhodný pro řadu farmaceutických a biomedicínských aplikací díky jeho vlastnostem, jako jsou biodegradabilita a biokompatibilita. Alginátové mikro- a nanočástice lze snadno získat indukčním gelováním s vápenatými ionty. Při přípravě alginátových částic se využívá tří technik: extruze, emulgace a sprejové sušení. Při extruzi je hydrokoloidní roztok vytlačován do lázně obsahující srážecí roztok. Při emulgaci se polymer přidává do rostlinného oleje, kde probíhá tvorba částic. Alginát se využívá například pro enkapsulaci bílkovin za účelem jejich pozvolného uvolnění a ochrany před působením žaludečních šťáv. Alginát našel své uplatnění také v oblasti nanokompozitu hydrogelu pro stabilizaci nanočástic stříbra, které v alginátu mohou růst po dobu 3 dnů a dalších 30 dní zůstanou stabilní [46].

2.8.5 Chitosan

Chitosan patří mezi přírodní polymery typu polysacharidů (poly-D-glukosamin). Získává se alkalickou deacetylací chitinu, několikahodinovým varem s 50 % hydroxidem sodným nebo enzymaticky působením N-deacetylázy. Má vynikající biologické vlastnosti, je netoxický, biokompatibilní, biodegradabilní a mukoadhezivní. Lze jej použít jako systém pro transport léčiv, jehož hlavním znakem je řízené uvolňování a cílení léčiva. Princip tvoření nanočástic je založen na interakci mezi negativně nabitými skupinami tripolyfosfátu sodného a pozitivními aminoskupinami chitosanu [16][46].

2.8.6 Liposomy

Liposomy jsou sférické částice vezikulární morfologie vznikající smísením lipidových komponent biologických membrán s vodou. Jedná se v podstatě o váčky (vezikuly) se stěnou složenou nejčastěji z fosfolipidů, případně z jiných amfifilních látek. Termínem liposomy se označují v první řadě vezikuly obalené dvojitou membránou, jejíž podstatnou část tvoří fosfatidylcholin (syn. lecitin) nebo směsi obsahující různé druhy fosfatidylcholinu (např. dipalmitoylfosfatidylcholin) a se zbytky mastných kyselin o různé délce řetězců (nad C₁₄) a s rozdílným stupněm nasycení. Mohou obsahovat i jiné fosfolipidy, jako je fosfatidylglycerol, fosfatidyletanolamin a sfingomyelin. Fosfolipidy vytvoří ve vodném prostředí biomembránu, skládající se z dvojvrstvy hydrofobních a hydrofilních konců sloučenin. Ve vodném prostředí dojde k orientování hydrofobních konců směrem k sobě v dvojvrstvě. I když je jejich tvorba závislá na přítomnosti vody, lze enkapsulovat hydrofilní i hydrofobní látky. Nová generace lipidických nanočástic, také zvaná jako *Multiple Lipid Nanoparticles*, nachází uplatnění jako nosiče léčiv při léčbě HIV. Xiaomina kolektiv se ve své práci zaměřili na optimalizaci metody pro zapouzdření velkého množství proteinů do unilamelárních liposomů a zkoumání interakce lipid-protein [34][48][49][50].



Obrázek 8: Schématický obrázek fosfolipidu a liposomu [49]

2.8.7 Druhy příprav lipidů

a) *Ultrazvuková enkapsulace*

Při ultrazvukové enkapsulaci dochází k vytvoření fosfolipidové dvojvrstvy působením tyčového ultrazvuku o vysoké intenzitě po krátkou dobu. Roztok se musí průběžně ochlazovat. Po připravení homogenního roztoku enkapsulované látky se do nádoby přidá směs fosfolipidů a cholesterolu. Následně se do směsi ponoří tyčový ultrazvuk a celá směs je opatrně dispergována [51].

b) *Odpařování na tenké vrstvě*

Směs fosfolipidu a cholesterolu je rozpuštěná v organickém rozpouštědle, v našem případě ve směsi chloroform:methanol v poměru 4:1. Poté dochází k odpaření organických rozpouštědel na vakuové rotační odparce při zhruba 50 °C. Na dně a po stěnách baňky s kulatým dnem se vytvoří suchý lipidový film, který je následně hydratován přidáním vodného roztoku enkapsulované složky. Takto promíchaná směs je ponořena do ultrazvuku po dobu zhruba pěti minut [52].

2.8.8 Otevírání liposomů

Z hlediska aplikace enkapsulovaných látek je velmi důležitý proces degradace fosfolipidové dvojvrstvy. To vede buď k úplné destrukci samotného liposomu, nebo se v membráně pouze vytvoří póry. Následně pak dochází k uvolnění enkapsulované látky. Spouštěcích mechanismů pro otevírání liposomů je mnoho, nejčastější je změna pH, změna redoxního potenciálu či chemické změny vyvolané účinkem nejrůznějších enzymů. Až doposud se liposomy používaly hlavně v oblasti medicíny. Jednalo se o cílené podávání léčiv. Nyní se hojně využívají pro perorální užití výživových doplňků za účelem postupného uvolnění látky. Ve vodě rozpustné vitaminy jsou vstřebávány jen v malém množství a mají nízkou biologickou dostupnost. Na rozdíl od toho, zapouzdření do liposomů nabízí velmi účinnou metodu jak obejít zničení živin v trávicím traktu trávicími enzymy a napomáhá vstřebání živin do buněk a tkání [34][53].

2.9 Metody využívané k analýze částic a enkapsulovaných látek

2.9.1 Spektrofotometrie

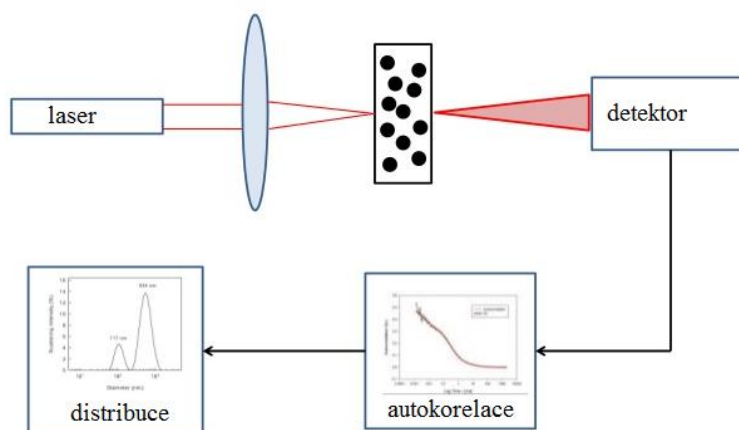
Spektrofotometrická metoda je založena na Lambertově-Beerově zákonu, který definuje vztah mezi absorbcí světla a vlastnostmi určité látky, kterou světlo prochází. Spektrofotometrické měření je založeno na platnosti Lambert-Beerova zákona. Zákon říká, že intenzita zbarvení roztoku (tzv. absorbance) je při konstantní tloušťce vrstvy měřeného roztoku (délka kyvety) a konstantní vlnové délce záření přímo úměrná molární koncentraci c ,

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad 1)$$

kde A je absorbance roztoku, ε je molární dekadický absorpční koeficient [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$], c je koncentrace roztoku [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$], d je délka kyvety [cm][54].

2.9.2 Dynamický rozptyl světla

Při obecném rozptylu světla je světlo, rozptýlené od různých částic, v náhodné fázi, takže nedochází k jeho interferenci. Při použití laseru je světlo koherentní a po jeho interakci s částicemi k interferenci dochází. Protože se malé částice v kapalině pohybují díky Brownovu pohybu, mění se vzdálenost, kterou musí urazit rozptýlené světlo k detektoru. Rozptýlené vlnění může interferovat v závislosti na vzdálenosti mezi částicí a detektorem. Výsledkem jsou fluktuace intenzity rozptýleného záření okolo průměrné hodnoty intenzity [55][56].



Obrázek 9: Schématické zobrazení DLS [55].

Metoda dynamického rozptylu světla (DLS), nazývaná rovněž jako foton korelační spektroskopie (PCS), je v současné době široce používána pro stanovení velikosti koloidních částic. Obvykle jsou výsledky v přiměřeně dobré shodě s výsledky elektronového mikroskopu. Určité nesrovnalosti ve výsledcích mohou být přisouzeny buď rozdílu mezi hydrodynamickým poloměrem (který může zahrnovat solvatační obal či naadsorbovanou vrstvu na povrchu částic) a skutečným poloměrem nebo změnám ve velikosti částice vznikajícím při přípravě vzorku pro elektronový mikroskop (vysoušení) či změnám pocházejícím od ozařování elektrony. V případě polydisperzních systémů se musí vzít do úvahy pohyb částic rozdílných velikostí a korelační funkce má poté složitější formu. Získaná průměrná velikost koloidních částic je vážena podle páté mocniny (tzv. Z-average), takže velké částice jsou v této hodnotě velmi nadhodnoceny a dokonce se může u některých přístrojů stát, že frakce malých částic se úplně ztratí ve velké intenzitě záření rozptýleného na větších částicích. Rozsah metody je oproti sedimentačním metodám výrazně jiný - dolní mez se dnes pohybuje okolo 0,5 nm a maximální pak okolo 3 μm (větší částice již nepodléhají Brownovu pohybu) [55][56].

2.9.3 Stanovení stability částic pomocí analýzy zeta potenciálu

Na základě Henryovy rovnice můžeme vyhodnotit elektroforetickou pohyblivost. Všechny částice v roztoku mají určitý náboj a po zavedení elektrického pole do obvodu dojde k vytvoření elektrické dvojvrstvy kolem každé částice. Jedna část dvojvrstvy se nazývá tzv. Sternova vrstva a nachází se v těsné blízkosti částice a vnější difúzní vrstva, mezi nimiž je potenciálová bariéra. Velikost této potenciálové bariéry může být vyjádřena velikostí zeta

potenciálu, což je potenciál na rovině skluzu mezi částicí a sdruženou dvojvrstvou s obklopujícím rozpouštědlem. Jestliže všechny částice v suspenzi mají vysoký negativní nebo pozitivní potenciál zeta, pak budou inklinovat k odpuzování se navzájem a částice nebudou mít žádnou tendenci se shlukovat. Nicméně jestliže částice mají nízké hodnoty zeta potenciálu, pak odpuzování nebude dostatečné k tomu, aby se zabránilo shlukování částic a jejich vysrážení jako vločky. Obecná dělicí čára mezi stabilní a nestabilní suspenzí se většinou bere jako +30 nebo -30 mV a částice, které mají zeta potenciál mimo tyto meze, se normálně považují za stabilní. Takový předpoklad však je velmi závislý na vlastnostech částic. Pokud je hodnota menší, částice se označuje za nestabilní a pravděpodobnost shlukování je značná. Během skladování se však částice mají tendenci shlukovat, tudíž nemůžeme zaručit, že pokud má čerstvě připravená částice dobrou stabilitu, že tomu tak bude i po uplynutí několika měsíců. Hodnota zeta potenciálu se odvíjí od hodnoty pH [55][58].

2.10 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) používá jako mobilní fáze látky kapalné. Stacionární fází pak může být buď tuhá látka, nebo kapalina ukotvena na tuhém nosiči, ve formě sorbentu. Tímto sorbentem protéká mobilní fáze. Mezi nejčastější uspořádání kapalinové chromatografie patří právě HPLC. Při tomto uspořádání je mobilní fáze přiváděna do systému pomocí čerpadla za vysokého tlaku. Díky fázovému rozhraní je umožněna distribuce látek mezi stacionární a mobilní fází. Při dělení látek pak dochází k opakovanému ustálení rovnováhy dělených látek mezi mobilní a stacionární fází [59][60].

Separace a eluce jednotlivých složek směsi je ovlivněna jak povahou stacionární fáze, tak povahou mobilní fáze. Při použití izokratické eluce mobilní fáze hovoříme o konstantním složení mobilní fáze, a naopak při gradientové eluci mobilní fáze se její složení během eluce programově mění ve prospěch silnější eluční složky. Izokratická eluce je vhodná pro dělení látek s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Naopak, gradientová eluce se uplatňuje při dělení látek s výrazně odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Separované zóny analytů vycházející z kolony jsou zaznamenány při průchodu detektorem a signál je převeden do podoby chromatografického záznamu, který je nazýván chromatogram (časová závislost intenzity veličiny, která je sledována detektorem). Charakteristickými křivkami chromatografického záznamu jsou eluční křivky (píky), které mají gausovský tvar [59][60].

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce je návrh vhodných aktivních složek s optimálním biologickým účinkem do energetických nápojů.

V rámci práce byly řešeny následující dílčí úkoly:

- Přehled energetických nápojů, jejich hlavních složek a metod analýzy obsahu aktivních látek
- Návrh vhodných přírodních složek a formy jejich přísad do energetických nápojů
- Vývoj metod pro analýzu složek komplexních přírodních extraktů
- Komplexní charakterizace nově navržených nápojů, účinky a dlouhodobá stabilita, senzorická analýza

4 PRAKTICKÁ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Použité standardy

- Katechin- Sigma-Aldrich (SRN)
- Kofein- Sigma-Aldrich (SRN)
- Kyselina Gallová- Sigma-Aldrich (SRN)
- Trolox- Sigma-Aldrich (SRN)
- Vitamin C- Sigma-Aldrich (SRN)

4.1.2 Chemikálie použité na spektrofotometrické stanovení

- ABTS- Sigma-Aldrich (SRN)
- Acetonitril- Sigma-Aldrich (SRN)
- Alginát sodný- Sigma-Aldrich (SRN)
- Bile salts – směs kyseliny cholové a deoxycholové – Sigma-Aldrich (SRN)
- Dusičnan sodný- p.a., LachNer, (ČR)
- Etanol- p.a., LachNer, (ČR)
- Folin- Ciocalteu činidlo- p.a., LachNer, (ČR)
- Hydrogen uhličitan sodný- p.a., LachNer, (ČR)
- Hydroxid sodný- p.a., LachNer, (ČR)
- Chlorid vápenatý- p.a., LachNer, (ČR)
- Cholesterol- Sigma-Aldrich (SRN)
- Lecithin, Sigma-Aldrich (SRN)
- Metanol- p.a., LachNer, (ČR)
- Pankreatin z vepřové slinivky – Sigma-Aldrich (SRN)
- Pepsin z prasečí žaludeční sliznice – Sigma-Aldrich (SRN)
- Peroxodisíran draselný- Sigma-Aldrich (SRN)
- Uhličitan sodný- p.a., LachNer, (ČR)






4.2 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy, Boeco (Nemecko)
- Centrifuga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen (Německo)
- DLS analyzátor Zetasizer ZS, Malvern (UK)
- Kolona Kinetex C₁₈- Phenomenex
- Kolona Rezex ROA- Phenomenex
- Kolona Zorbax NH₂-Agilent
- Pumpa: LPG-3400SD
- Temperovaná třepačka Heidolph Unimax 1010, Labicom (ČR)
- ThermoFisher Scientific HPLC/PDA/RI (USA): Programátor gradientu
- UltiMate 3000 DAD, Refraktometrický detektor: RefractoMax 520
- UltiMate 3000 Fotometrický detektor
- Ultrazvukový homogenizátor Sonoplus HS 3200, Bandeline
- Vortex, TK3S, Kartel spa (USA)

4.3 Vzorky

4.3.1 Bylinné extrakty

Pro extrakci byly použity vzorky Acai, Aceroly, Macy, Goji a ženšenu. Vzorky jsou běžně dostupné na trhu.

Vzhled	Název a složení
	Acai Omega 3, 6 a 9 nenasycené mastné kyseliny Vitaminy: A, B1, B2, B3, B6, B12, C, D, E Minerály: K, Cr, Mg, Zn, Ca
	Acerola Hlavní složkou je vitamin C ale obsahuje i jiné vitaminy: A, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, E Minerály: Fe, P, Ca, Zn,
	Maca Bílkoviny Esenciální aminokyseliny Mastné kyseliny Minerály Vitaminy Vlákna
	Goji Čistá voda Goji Med
	Ženšen Ženšen Včelí mateří kašička a med Sorbit draselný Destilovaná voda

4.3.2 Čajové základy

Tabulka 3: Čajové základy

Vzorek	Celý název	Země původu	Výrobce
Bílý čaj	White downy	Čína	Oxalis
Černý čaj	Ceylon Ruhuna Golden Garden OP1	Srí Lanka	Oxalis
Zelený čaj	China Sencha	Čína	Oxalis
Matcha	Bio Matcha Tea Harmony	Japonsko	Matcha Tea

4.3.3 Energetické nápoje

- Red Bull
- Rock Star
- Semtex
- Crazy wolf cola
- Bubble Tea – Jahoda, Bubbleology

4.4 Příprava vzorků

4.4.1 Bylinné extrakty

Tabulka 4: Vzorky bylinných extraktů a jejich příprava

Vzorek	Příprava
Acerola	2 g do 20 ml destilované vody, 1 h na třepačce
Acai	2 ml do 18 ml destilované vody, 1 h na třepačce
Maca	2 g do 20 ml destilované vody, 1 h na třepačce
Goji	2 ml do 18 ml destilované vody, 1 h na třepačce
Ženšen	2 ml do 18 ml destilované vody, 1 h na třepačce

4.4.2 Čajové základy

Tabulka 5: Vzorky čajových základů a jejich návod k přípravě

Vzorek	Příprava
Bílý čaj	2 g do 150 ml vody o teplotě 80 °C, 2-3 minuty
Zelený čaj	2 g do 150 ml vody o teplotě 70-80 °C, 3-4 minuty
Černý čaj	2 g do 150 ml vody o teplotě 100 °C, 2-3 minuty
Matcha Tea	2 g do 150 ml vody o pokojové či vyšší teplotě do 80 °C

4.5 Chromatografické metody

4.5.1 Stanovení kofeinu metodou HPLC s UV-VIS detekcí

Vzorky kofeinu byly analyzovány na koloně Kinetex-Phenomenex(150 x 4,6 mm) naplněné reversní fází C 18 (5 μm) při 30 °C. Aplikace na kolonu byla provedena pomocí nástřiku do dávkovacího ventilu o objemu smyčky 20 μl . Eluce probíhala izokraticky při průtoku mobilní fáze 0,6 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Jako mobilní fáze byl použit roztok vody a acetonitrilu pro HPLC 20:80. Vzorky byly detekovány na spektrofotometrickém detektoru při vlnové délce 280 nm. Z chromatogramů o různých koncentracích kofeinu byly zjištěny plochy píků a sestavena externí kalibrační křivka pro kvantitativní stanovení koncentrace kofeinu.

4.5.2 Stanovení Vitaminu C metodou HPLC s UV-VIS detekcí

Vzorky s obsahem vitaminu C byly analyzovány na koloně Zorbax-Agilent (150 x 4,6 mm), NH_2 (5 μm) při 30 °C. Aplikace na kolonu byla provedena pomocí nástřiku do dávkovacího ventilu o objemu smyčky 20 μl . Eluce probíhala izokraticky při průtoku mobilní fáze 0,6 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Jako mobilní fáze byl použit 5 % roztok acetonitrilu. Vzorky byly detekovány na spektrofotometrickém detektoru při vlnové délce 268 nm. Z chromatogramů o různých koncentracích vitaminu C byly zjištěny plochy píků a byla sestavena externí kalibrační křivka pro kvantitativní stanovení koncentrace vitaminu C.

4.5.3 Stanovení množství sacharidu metodou HPLC s RI detekcí

Vzorky glukosy a fruktosy byly analyzovány na koloně Rezex-Phenomenex naplněné reversní fází ROA Organic Acid 8 % (300 x 7,8 mm) při 60 °C. Aplikace na kolonu byla provedena pomocí nástřiku do dávkovacího ventilu o objemu smyčky 20 μl . Eluce probíhala izokraticky při průtoku mobilní fáze 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Jako mobilní fáze byl použit 5mM roztok kyseliny sírové. Vzorky byly detekovány na refraktometrickém detektoru. Z chromatogramů o různých koncentracích glukosy a fruktosy byly zjištěny plochy píků a byla sestavena externí kalibrační křivka pro kvantitativní stanovení koncentrace glukosy a fruktosy.

4.6 Spektrofotometrické metody

4.6.1 Stanovení celkových polyfenolů

Při reakci Folin-Ciocalteuova činidla s polyfenoly vzniká modrý komplex. Do zkumavky je přidáno 1 ml desetkrát zředěného Folin-Ciocalteuova činidla, 1 ml vody a 50 μl vzorku. Směs je promíchána a ponechána 5 minut stát. Poté je k roztoku přidán 1 ml nasyceného uhličitanu sodného. Po 15 minutách stání je měřena absorbance při 750 nm. Každý vzorek byl analyzován třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka pomocí software Microsoft Office Excel. Koncentrace neznámého vzorku je vypočítána z rovnice z grafu závislosti absorbance na koncentraci standardu, kterým je kyselina gallová.

4.6.2 Stanovení celkových flavonoidů

Do zkumavky je přidáno 0,5 ml vzorku, 1,5 ml vody, 0,2 ml dusitanu sodného. Po pěti minutách je přidáno 0,2 ml chloridu hlinitého. Po dalších pěti minutách se k roztoku přidá 1,5 ml hydroxidu sodného a 1 ml vody. Po 15 minutách je měřena absorbance vzniklého červeného komplexu při 510 nm.

Každý vzorek byl analyzován třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka pomocí software Microsoft Office Excel. Koncentrace neznámého vzorku je poté vypočítána z rovnice z grafu závislosti absorbance na koncentraci standardu, kterým je katechin.

4.6.3 Stanovení antioxidační aktivity

ABTS byl rozpuštěn v destilované vodě na koncentraci $c = 7 \text{ mmol/l}$. Radikálový anion $\text{ABTS}^{\cdot+}$ byl získán reakcí s $2,45 \text{ mmol/l}$ peroxodisíranem draselným. Roztok byl nejméně 12 hodin ponechán ve tmě při laboratorní teplotě. Před použitím byl $\text{ABTS}^{\cdot+}$ zředěný ethanolem na absorbanci přibližně $A = 0,700$ při $\lambda = 734 \text{ nm}$ proti ethanolu. Do zúžené kyvety byl napipetován 1 ml $\text{ABTS}^{\cdot+}$ a $10 \mu\text{l}$ extraktu. Byl zaznamenán pokles absorbance v čase 0 a 10 minut. Jako blank byl použit 1 ml $\text{ABTS}^{\cdot+}$ a $10 \mu\text{l}$ destilované vody. Pro kalibraci byl připraven roztok Troloxu v koncentračním rozmezí $50 - 400 \mu\text{g/ml}$.

4.7 Příprava částic

4.7.1 Příprava alginátových částic

20 ml vodného extraktu bylo 1:1 smícháno s roztokem 2% alginátu. Vzniklá směs byla postupně pipetována automatickou pipetou o objemu 1 ml do 1% srážecího roztoku chloridu vápenatého o objemu $10\text{-}15 \text{ ml}$. Částice byly v roztoku ponechány polymerizovat po dobu 20. Poté byly všechny částice odfiltrovány a promyty 5 ml destilované vody a uchovány pro další stanovení.

4.7.2 Příprava liposomů

4.7.2.1 Příprava částic pomocí ultrazvuku

450 mg sojového lecitinu a 50 mg cholesterolu bylo přidáno k 20 ml vodného extraktu. Poté byla směs ultrazvukována do vzniku liposomů.

4.7.2.2 Příprava částic metodou odpařování na tenké vrstvě

80 mg sojového lecitinu a 10 mg cholesterolu bylo rozpuštěno v 10 ml směsi chloroform : methanol v poměru $8 : 2$. Roztok byl převeden do baňky a odpařen na vakuové odparce. K odparku bylo přidáno 10 ml vodného extraktu a směs byla ultrazvukována, dokud se lipidový film na baňce zcela nerozpustil.

4.8 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost byla stanovena na základě stanovení obsahu celkových polyfenolů. Pro stanovení enkapsulační účinnosti se nejprve změřila koncentrace polyfenolu v extraktu před enkapsulací. Po enkapsulaci byla změřena koncentrace polyfenolu v supernatantu. Při stanovení enkapsulační účinnosti pomocí této metody byla vypočítána koncentrace celkových polyfenolů v extraktech před a po enkapsulaci. Po odečtení těchto hodnot bylo vypočteno enkapsulované množství polyfenolů v částicích a v procentech uvedena enkapsulační účinnost.

4.9 Stanovení velikosti a distribuce částic pomocí DLS

Roztoky částic byly 100x zředěné destilovanou vodou. Do kyvety byl napipetován 1 ml zředěného roztoku částic. Kyveta byla umístěna do přístroje DLS Malvern Zetasizer ZS a byla zjištěná distribuce velikosti částic, jejich průměrná velikost a polydisperzita.

4.10 Stanovení stability částic pomocí zeta potenciálu.

Roztoky částic byly 100x zředěny destilovanou vodou. Do kyvety byl napipetován 1 ml roztoku částic a byl vložen elektrodový nástavec. Kyveta byla umístěna do DLS přístroje Malvern Zetasizer ZS a byl měřen zeta potenciál. Stabilita částic byla odvozená z hodnoty zeta potenciálu. Jako stabilní částice jsou považovány ty, jejichž hodnota zeta potenciálu nad ± 30 mV.

4.11 Sledování dlouhodobé stability částic

Pro studium dlouhodobé stability částic byly vzorky uchovávány při teplotě 5 °C ve vodném prostředí po dobu 3 měsíců. Dlouhodobá stabilita byla vypočítána na základě množství uvolňování polyfenolů z jednotlivých částic.

4.12 Stabilita částic v modelovém fyziologickém prostředí

4.12.1 Žaludeční šťáva

Žaludeční šťáva byla připravena z 0,25 g pepsinu, který byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody. Následně bylo přidáno 0,84 ml 35% HCl. Hodnota pH byla upravena na 0,9. Vzorky pro sledování stability částic byly připraveny v poměru 1:1 (žaludeční šťáva: částice s enkapsulovaným bylinným extraktem). Byla změřena koncentrace uvolněných polyfenolů v čase nula a poté po 45 minutách působení umělé žaludeční šťávy, přičemž byly vzorky inkubovány při 37 °C. Z rozdílu koncentrací bylo vypočteno množství polyfenolů uvolněných z částic působením žaludeční šťávy.

4.12.2 Pankreatická a žlučová šťáva

Pankreatická šťáva byla připravena z 0,25 g pankreatinu a 1,5 g NaHCO₃, které byly rozpuštěny ve 100 ml destilované vody, pH bylo upraveno na hodnotu 9. Žlučová šťáva byla připravena přidáním 0,4 g žlučových solí do 100 ml fosfátového pufru o pH 8. Poté bylo smícháno 5 ml žlučové šťávy s 15 ml pankreatické šťávy. Takto připravený roztok byl přidán k částicím po 45 minutách působení v žaludečních šťávách. Opět byla změřena koncentrace polyfenolů v čase nula a po 2 hodinách působení umělé pankreatické a žlučové šťávy při 37 °C. Z rozdílu koncentrací bylo vypočteno množství polyfenolů uvolněných z částic působením pankreatické a žlučové šťávy.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Předložená práce je zaměřena na vývoj a přípravu nového energetického nápoje. Cílem práce bylo srovnání na trhu dostupných energetických nápojů, stanovení hlavních aktivních složek a zavedení metod pro jejich analýzu. Dále byl proveden návrh nového energetického nápoje s obsahem makro- a mikročástic obsahujících aktivní složky. Navržený produkt byl na závěr komplexně charakterizován včetně senzorické analýzy.

5.1 Charakterizace Energetických drinků

První část práce byla zaměřena na charakterizaci vybraných energetických nápojů. Zakoupené nápoje byly analyzovány na obsah přítomných aktivních složek. Sledován byl obsah kofeinu a vitamínu C, dále byl sledován obsah sacharidů a polyfenolických složek.

5.1.1 Stanovení kofeinu metodou HPLC s UV-VIS detekcí

Obsah kofeinu ve vzorcích byl stanoven dle návodu uvedeném v kapitole 4.5.1. Pro zjištění množství kofeinu byla proměřena kalibrační křivka. Z rovnice kalibrační křivky bylo vypočteno množství kofeinu v jednotlivých vzorcích.

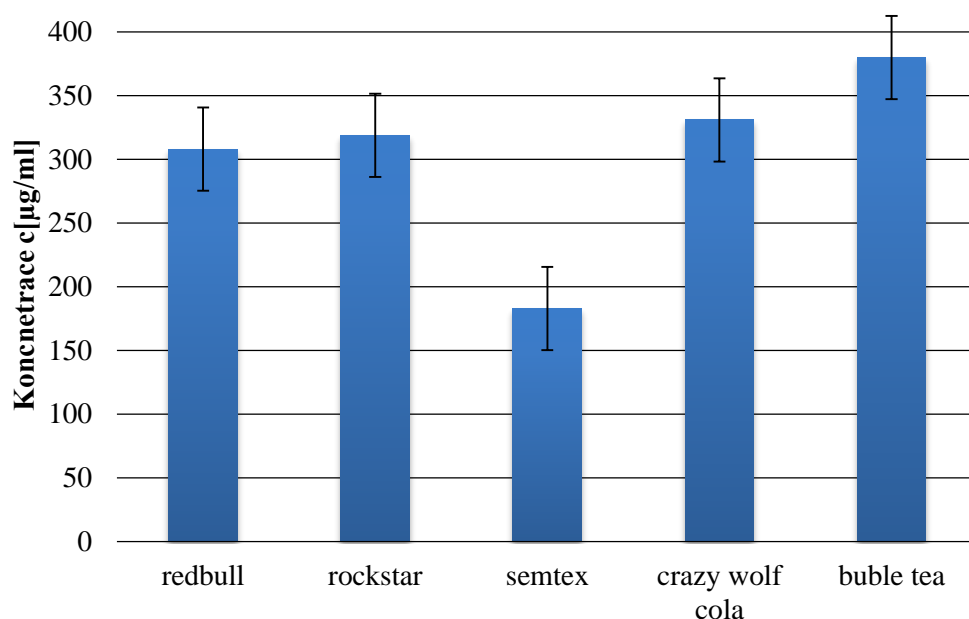
$$y = 1417,1 \cdot x + 14,691 \left[\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \right] \quad 2)$$

Všechna měření byla provedena třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr. Získané hodnoty jsou zaznamenány v následující tabulce (*Tabulka 6*).

Tabulka 6: koncentrace kofeinu v nápojích dostupných na trhu

Vzorek	Koncentrace $c[\mu\text{g/ml}]$	Koncentrace $c[\text{mg/porci}]$
Redbull	$308 \pm 0,9$	77
Rockstar	$319 \pm 0,8$	95
Semtex	$183 \pm 0,5$	55
Crazy wolf cola	$331 \pm 0,9$	82
Buble tea	$380 \pm 0,9$	95

Z výsledků je patrné, že nejvyšší množství kofeinu $380 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ obsahoval Buble tea, kde byl jako základ použit zelený čaj. V jedné porci tohoto nápoje o objemu 250 ml tak získáme 95 mg kofeinu. Obsah kofeinu v energetických nápojích Redbull, Rock Star a Crazy Wolf byl srovnatelný. Jedna porce nápoje Redbull, nebo Crazy Wolf pak obsahuje přibližně 80 mg kofeinu. V nápoji Rock Star, který se prodává v plechovkách o velikosti 300 ml, nalezneme 95 mg kofeinu. Nejnižší obsah kofeinu z testovaných vzorků byl naměřen v energetickém nápoji Semtex $183 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ který se prodává v plechovkách o objemu 300 ml. Výsledný obsah kofeinu na jednu plechovku tohoto nápoje je tak přibližně 55 mg. Pro lepší přehlednost byl vytvořen *Graf 1*.



Graf 1: Porovnání obsahu kofeinu

5.1.2 Stanovení množství sacharidu metodou HPLC s RI detekcí

Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie byla dále ve vybraných vzorcích sledována přítomnost sacharidů. Charakterizovali jsme obsah glukosy a fruktosy. Stanovení bylo provedeno dle návodu v kapitole 4.5.3. Všechna měření byla provedena dvakrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr. Pro stanovení obsahu glukosy a fruktosy v energetických nápojích byla rovněž sestrojena kalibrační křivka závislosti plochy píku na koncentraci jednotlivých sacharidů.

Kalibrační křivka glukosy:

$$y = 0,1611 \cdot x - 0,2924 \left[\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \right] \quad 3)$$

Kalibrační křivka fruktosy:

$$y = 0,1617 \cdot x - 0,1851 \left[\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \right] \quad 4)$$

Z naměřených kalibračních křivek byl vypočten obsah glukosy a fruktosy v jednotlivých energetických nápojích. Data byla zapsána do *Tabulka 7*.

Tabulka 7: Obsah cukru v energetických nápojích

	Fruktosa	Glukosa	Deklarované množství cukru	Zjištěné celkové množství cukru
Vzorek	Koncentrace [mg/100 ml]	Koncentrace [mg/100 ml]	Koncentrace [mg/100 ml]	Koncentrace [mg/100 ml]
Semtex	20 297 ± 3	2 436 ± 1	12 000	22 733 ± 4
Rockstar	27 003 ± 5	3 935 ± 1	13 500	30 938 ± 6
Crazy wolf	25 286 ± 4	2 621 ± 1	10 800	27 907 ± 5
Red Bull	11 079 ± 3	3 829 ± 2	10 000	14 908 ± 5
Bubble Tea	17 564 ± 3	5 654 ± 1	18 000	23 218 ± 4

Z Tabulky 7 můžeme vidět, že množství obsahu cukru v Bubble Tea a komerčně dostupných energetických nápojích uvedeném na obalu výrobku je ve všech případech menší a v některých dokonce 3x. Takto vysoký příjem cukru za krátkou dobu může v některých případech vést k zdravotním problémům.

5.1.3 Stanovení vitamínu C metodou HPLC s UV-VIS detekcí

Pro zjištění množství vitamínu C v námi zvolených energetických nápojích byla proměřena kalibrační křivka podle postupu uvedeného v metodách pro stanovení vitamínu C (kap.4.5.2). Z rovnice kalibrační křivky bylo vypočteno množství vitamínu C v jednotlivých vzorcích.

$$y = 2,9195 \cdot x - 0,4847 \left[\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \right] \quad 5)$$

V žádném z testovaných vzorků energy drinků, včetně bubble tea, nebyl detekován obsah vitamínu c.

5.1.4 Stanovení obsahu polyfenolických složek

Spektrofotometrické stanovení celkových polyfenolů ve vybraných energetických nápojích bylo provedeno podle postupu v kapitole 4.6.1. Všechna měření byla provedena třikrát a z průměru hodnot byla zjištěna koncentrace polyfenolů. Koncentrace polyfenolů byla vypočítaná z rovnice kalibrační křivky kyseliny gallové:

$$y = 1,412 \cdot x \left[\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \right] \quad 6)$$

Tabulka 8: Koncentrace polyfenolu v komerčně dostupných energetických nápojích

Vzorek	Koncentrace ve 250 ml nápoje [mg/150ml]
Bubble Tea	0,85 ± 0,01
Crazy wolf	Nedetekováno
Red Bull	Nedetekováno
Rockstar	Nedetekováno
Semtex	Nedetekováno

V žádném z testovaných vzorků energy drinků nebyl detekován obsah polyfenolů. Nízká koncentrace polyfenolů byla stanovena pouze u výrobku bubble tea.

5.2 Návrh energetického nápoje a jeho charakterizace

Další část práce byla zaměřena na návrh nového energetického nápoje. Do kofeinového základu byly dodány přírodní extrakty s vysokým obsahem antioxidantů a vitamínu. V práci byla sledována rovněž možnost přidavku těchto přírodních složek v enkapsulované formě.

5.2.1 Základ energetického nápoje

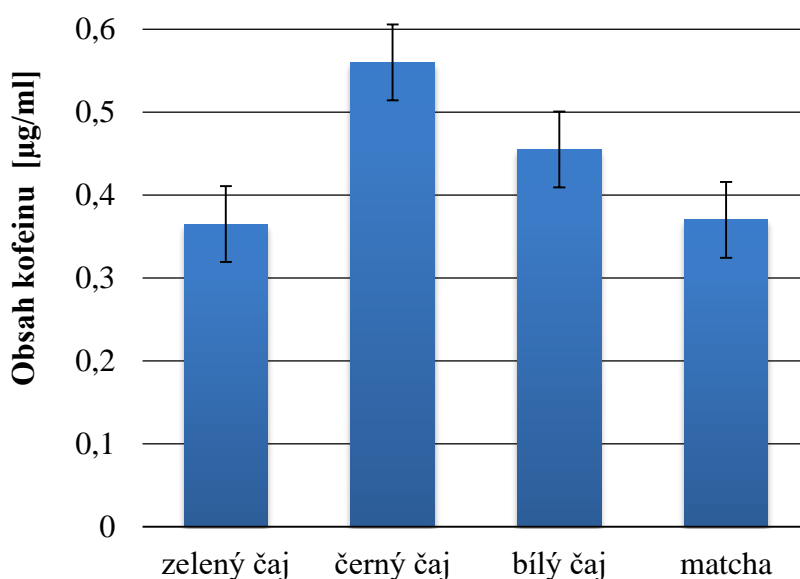
Jako základ budoucího energetického nápoje byly zvoleny různé druhy čajů. Celkem byly vybrány 4 základy: bílý čaj druhu White Downy, černý čaj druhu Ceylon Ruhuna Golden Garden OP1, zelený čaj druhu China Sencha a Matcha tea, což jsou drcené lístky zeleného čaje.

Všechny tyto základy byly podrobeny analýze a připraveny podle návodu uvedeného na obalu. Poté byl stanoven obsah kofeinu, rovněž bylo provedené stanovení celkových polyfenolů a flavonoidů.

5.2.1.1 Stanovení kofeinu metodou HPLC s UV-VIS detekcí

Obsah kofeinu ve vzorcích byl stanoven s využitím HPLC dle návodu uvedeném v kapitole 4.5.1. Všechna měření byla provedena třikrát.

Po dosažení naměřených výsledků ploch píků byl vypočten obsah kofeinu v jednotlivých kofeinových základech a pro porovnání byly hodnoty zaznamenány do sloupcového grafu (Graf 2).



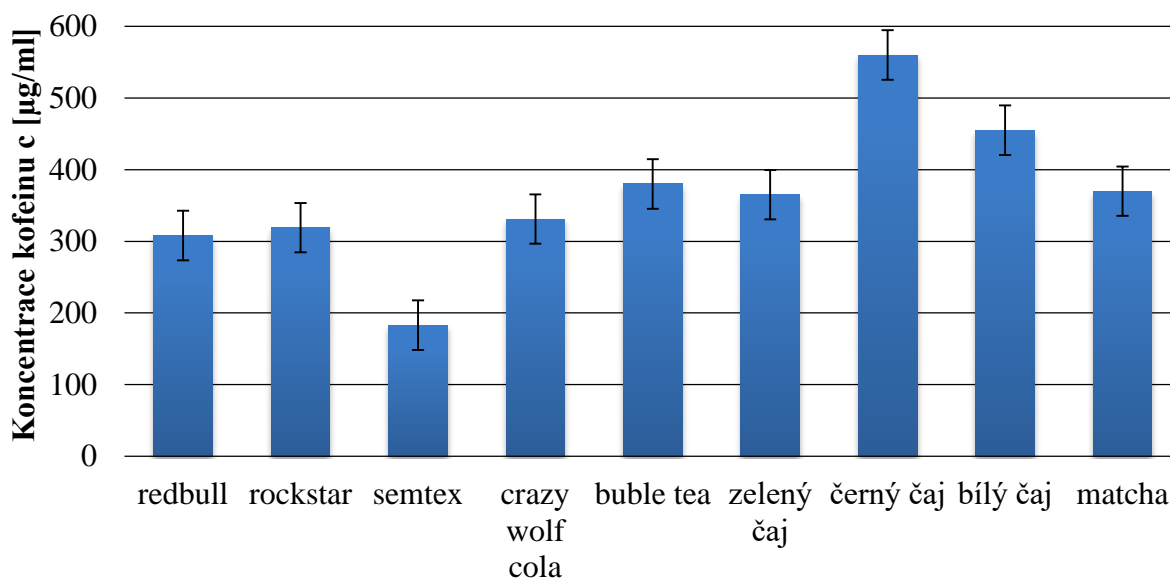
Graf 2: Obsah kofeinu v čajových základech

Z dosažených výsledků, které jsou zaznamenány do *Tabulky 9* je patrné, že nejvyšší obsah kofeinu $560 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ je v černém čaji. V jedné porci energetického nápoje o objemu 250 ml by tak bylo přijato 140 mg kofeinu. Na místě druhém je čaj bílý s obsahem 113 mg kofeinu na porci energetického nápoje. V zeleném čaji bylo zjištěno 91 mg kofeinu na porci energetického nápoje. V matcha tea základu bylo detekováno přibližně stejné množství kofeinu jako v klasickém zeleném čaji, 93 mg kofeinu na porci nápoje. Všechny čajové základy byly připraveny podle návodu z tabulky (*Tabulka 5*).

Tabulka 9: Obsah kofeinu v jednotlivých základech

Vzorek	Koncentrace ve 250 ml nápoje [mg/250ml]	Koncentrace [µg/ml]
Bílý čaj	$113 \pm 0,1$	455 ± 3
Černý čaj	$140 \pm 0,1$	560 ± 4
Zelený čaj	$91 \pm 0,1$	365 ± 2
Matcha tea	$93 \pm 0,1$	370 ± 2

Pro srovnání obsahu kofeinu v čajových základech a v komerčně dostupných energetických nápojích či bubble tea drinku byl vytvořen *Graf 3*.



Graf 3: Srovnání obsahu kofeinu v komerčně dostupných energetických nápojích a v čajích

Z grafu je patrné, že pokud připravíme čaje dle návodu o objemu 250 ml, bude obsah kofeinu větší nebo srovnatelný s energetickými nápoji na trhu. Tímto se čaje stávají použitelné pro aplikaci jako energetické nápoje.

5.2.1.2 Stanovení celkových polyfenolů

Spektrofotometrické stanovení celkových polyfenolů v čajových základech bylo provedeno podle postupu v kapitole 4.6.1. Všechna měření byla provedena třikrát a z průměrných hodnot byla vypočítána koncentrace polyfenolů. Výsledky jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 10).

Tabulka 10: Koncentrace polyfenolu v čajových základech

Vzorek	Koncentrace ve 250 ml nápoje [mg/250ml]	Koncentrace [mg/g]
Bílý čaj	0,915 ± 0,01	41,18 ± 1,1
Černý čaj	1,005 ± 0,01	45,25 ± 1,12
Zelený čaj	1,075 ± 0,12	76,73 ± 1,8
Matcha Tea	3,415 ± 0,14	153,72 ± 2,3

Na základě takto naměřených hodnot je patrné, že největší obsah polyfenolických látek je v matcha tea a nejmenší v čaji bílém. Čaj bílý obsahoval 41,18 mg polyfenolů na 1 g sušiny. V čaji černém bylo změřeno 45,25 mg polyfenolů na 1 g sušiny. Čaj zelený obsahoval 76,73 mg polyfenolů na 1 g sušiny. Matcha tea obsahovala 153,72 mg polyfenolů na 1 g sušiny.

5.2.1.3 Stanovení celkových flavonoidů

Stanovení celkových flavonoidů bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 4.6.2. Všechna měření byla provedena třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr. Koncentrace flavonoidů v extraktech byla vypočítána z rovnice z kalibrační křivky katechinu:

$$y = 2,874 \cdot x \left[\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \right] \quad 7)$$

Tabulka 11: Koncentrace flavonoidů v čajových základech

Vzorek	Koncentrace ve 250 ml nápoje [mg/250 ml]	Koncentrace [mg/g]
Bílý čaj	0,29 ± 0,01	12,9 ± 0,9
Černý čaj	0,18 ± 0,01	8,1 ± 0,8
Zelený Čaj	0,09 ± 0,01	4,1 ± 0,3
Matcha tea	1,41 ± 0,03	6,3 ± 0,3

Z *Tabulky 11* je patrné, že největší obsah flavonoidu je v Bílém čaji a nejnižší v čaji Zeleném. Čaj bílý obsahoval 12,9 mg flavonoidů na 1 g sušiny. V čaji černém bylo změřeno 8,1 mg flavonoidů na 1 g sušiny. Čaj zelený obsahoval 4,1 mg flavonoidů na 1 g sušiny, což je nejméně ze všech čajových základů. Matcha tea obsahovala 6,3 mg flavonoidů na 1 g sušiny.

5.2.1.4 Stanovení antioxidační aktivity

Pro vyhodnocení celkové antioxidační aktivity vzorku byla použita metoda ABTS, jenž spočívá v měření schopnosti vzorku zhášet kation–radikál ABTS^{•+}. Výsledky jsou vztaženy na ekvivalentní množství troloxu a jsou vyjádřeny v µg troloxu/ 1 ml vzorku. Výsledky jsou uvedeny v *Tabulce 12*. Nejvyšší koncentrace antioxidačně aktivních látek byla stanovena v čaji černém a nejmenší v Matcha tea.

Tabulka 12: Antioxidační aktivita čajových základů

Extrakt	Absorbance	Koncentrace [µg/ml]	Koncentrace [mg/g]
Bílý čaj	0,854	637,6 ± 3,1	47,8
Černý čaj	0,993	741,1 ± 3,3	55,6
Zelený Čaj	0,896	652,5 ± 3,1	50,2
Matcha tea	0,745	555,9 ± 2,9	41,7

5.2.2 Obohacení energetického nápoje

Pro obohacení budoucího energetického nápoje byly zvoleny méně známé bylinné a ovocné extrakty s vysokým obsahem antioxidantů a vitaminů. Testovány byly acai, acerola, maca, goji a ženšen. Všechny sypké extrakty byly naváženy v poměru 2 g do 20 ml destilované vody a ponechány na třepačce po dobu 1 hodiny. Tekuté tinktury byly 10x zředěny na celkový objem 20 ml a rovněž byly ponechány na třepačce po dobu 1 hodiny.

5.2.2.1 Stanovení množství vitaminu C metodou HPLC s UV-VIS detekcí

Pro zjištění množství vitaminu C v námi zvolených bylinných či ovocných extraktech byla použita metoda využitím HPLC(kap.4.5.2). Všechna měření byla provedena dvakrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr. Získané hodnoty jsou zaznamenány v následující tabulce (*Tabulka 13*).

Tabulka 13: Koncentrace vitaminu C ve vzorcích

Vzorek	Koncentrace c[μ g/ml]	Koncentrace [mg/g]
Acai	$4,8 \pm 0,0$	0,05
Acerola	$16504,7 \pm 3,2$	165,05
Maca	$0,6 \pm 0,0$	0,01
Goji	$27,3 \pm 0,1$	0,27
Ženšen	$126,8 \pm 0,5$	1,27

Z *Tabulky 13* je patrné, že Acerola opravdu splnila všechna očekávání a jak bylo uvedeno v kapitole. 2.6.6 její obsah vitaminu C v extraktu byl velmi vysoký a v porovnání s ostatními byl tak obsah mnohonásobě vyšší a to 165 mg/g.

5.2.2.2 Stanovení množství sacharidu metodou HPLC s RI detekcí

Pro zjištění množství sacharidu v námi zvolených bylinných či ovocných extraktech byla použita metoda pro stanovení glukosy a fruktosy (kap.4.5.3) Po dosazení naměřených výsledků ploch pík do kalibračních křivek byl vypočten obsah fruktosy a glukosy v jednotlivých extraktech a pro porovnání byly hodnoty zaznamenány do *Tabulky 14*.

Tabulka 14: Obsah cukru v bylinných extraktech

Vzorek	Fruktosa	Glukosa	Deklarované množství cukru	Zjištěné celkové množství cukru
	Koncentrace [mg/100 ml]	Koncentrace [mg/100 ml]	Koncentrace [mg/100 ml]	Koncentrace [mg/100 ml]
Acai	$2\,856 \pm 15$	$1\,934 \pm 4$	4 000	$4\,790 \pm 19$
Acerola	$3\,547 \pm 21$	$3\,905 \pm 9$	8 000	$7\,452 \pm 30$
Maca	59 ± 3	$5\,430 \pm 11$	7 000	$5\,489 \pm 14$
Goji	$28\,239 \pm 43$	$2\,426 \pm 5$	20 000	$30\,665 \pm 48$
Ženšen	$35\,757 \pm 47$	$3\,069 \pm 6$	30 000	$38\,826 \pm 53$

Jak můžeme vidět, tak nejvyšší obsah cukru je podle očekávání v tinkturách Goji 30,7 g na 100 ml a Ženšenu 38,8 g na 100 ml. Obě tyto tinktury obsahovaly med. V extraktu Aceroly bylo naměřeno přibližně 7,45 g cukru na 100 ml. V extraktu Macy 5,5 g cukru na 100 ml. Obsah cukru v Acai byl přibližně 4,8 g na 100 ml.

5.2.2.3 Stanovení celkových polyfenolů

Spektrofotometrické stanovení celkových polyfenolů v bylinných extraktech bylo provedeno podle postupu v kapitole 4.6.1. Všechna měření byla provedena třikrát a z průměru naměřených hodnot byla vypočítána koncentrace polyfenolů v extraktech. Z *Tabulek 15 a 16* je patrné, že Acerola, která obsahovala mnohonásobně větší množství vitaminu C obsahuje také několikanásobně větší množství polyfenolů než ostatní extrakty.

Tabulka 15: *Koncentrace polyfenolu v extraktech*

Vzorek	Koncentrace v extraktu [mg/g]
Acerola	25,40 ± 0,06
Maca	5,10 ± 0,41

Tabulka 16: *Koncentrace polyfenolu v extraktech*

Vzorek	Koncentrace v extraktu [mg/ml]
Acai	0,57 ± 0,08
Goji	3,00 ± 0,05
Ženšen	0,78 ± 0,02

5.2.2.4 Stanovení celkových flavonoidů

Stanovení celkových flavonoidů bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 4.6.2. Extrakce byla provedena v destilované vodě. Všechna měření byla provedená třikrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr.

Tabulka 17: *Koncentrace flavonoidů v extraktech*

Vzorek	Koncentrace v extraktu [mg/g]
Acerola	0,85 ± 0,04
Maca	0,14 ± 0,01

Tabulka 18: *Koncentrace flavonoidů v extraktech*

Vzorek	Koncentrace v extraktu [mg/ml]
Acai	0,26 ± 0,01
Goji	1,19 ± 0,11
Ženšen	0,53 ± 0,03

Z *Tabulek 17 a 18* je patrné, že největší obsah flavonoidů je v extraktech aceroly 0,85 mg/g a goji 1,19 mg/ml. V extraktu Acai bylo přibližně 0,26 mg/g flavonoidů a v extraktu ženšenu 0,53 mg/g flavonoidů. Nejmenší množství flavonoidů bylo stanoveno v extraktu macy 0,14 mg/g.

5.2.2.5 Stanovení antioxidační aktivity

Pro vyhodnocení celkové antioxidační aktivity vzorku byla použita metoda ABTS, jenž spočívá v měření schopnosti vzorku zhášet kation–radikál ABTS•+. Výsledky jsou uvedeny v *Tabulkách 19* a *20*. Nejvyšší koncentrace antioxidačně aktivních látek byla stanovena v extraktech Goji, Macy a Aceroly, nejmenší naopak v Acai. Extrakty, které byly bohaté na polyfenoly, byly také lepšími antioxydanty.

Tabulka 19: Antioxidační aktivita bylinných extraktu

Extrakt	Absorbance	koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]	koncentrace [mg/g]
Acerola	0,630	470,2	4,7
Maca	0,699	168,5	1,69

Tabulka 20: Antioxidační aktivita bylinných extraktu

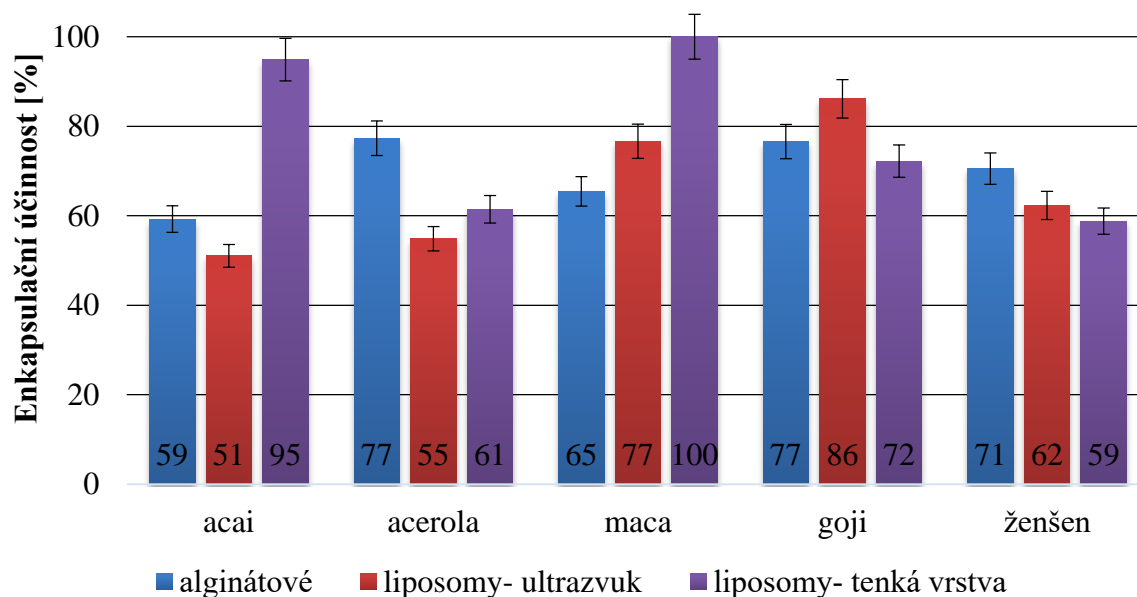
Extrakt	Absorbance	koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]	koncentrace [mg/ml]
Acai	0,293	218,5	2,2
Goji	0,746	556,6	5,6
ženšen	0,410	305,6	3,1

5.2.3 Enkapsulace aktivních látek

V další části práce byla sledována především možnost obohacení energetického základu o přírodní složky v enkapsulované formě. Extrakty z acai, aceroly, macy, goji a ženšenu byly enkapsulovány do liposomů a alginátových částic.

5.2.3.1 Enkapsulační účinnost polyfenolů

Metody pro přípravu jednotlivých typů částic jsou uvedeny v kapitole 4.7. Všechny vzorky s lipidickými částicemi po enkapsulaci danými metodami byly centrifugovány při 14 000 ot./min. Supernatant byl slit, a bylo v něm stanoveno množství polyfenolů, stejně jako v roztoku před enkapsulací. Z těchto dvou hodnot byla poté vypočítána enkapsulační účinnost polyfenolů dané metody. Pro každý vzorek bylo měření opakováno třikrát a ze získaných hodnot byl získán průměr. Rozptyl hodnot měření jednotlivých vzorků nebyl větší než 5 %.



Graf 4: Stanovení enkapsulační účinnosti

Z výsledku je patrné, že ani jedna metoda nebyla výrazně účinnější než ostatní. Liposomy připravené metodou odpaření na tenké vrstvě sice vykazovaly lepší enkapsulační účinnost, ale co se týče celkového pohledu, tak při proměření na DLS bylo zjištěno, že takto připravené částice mají tendenci se shlukovat a tvořit agregáty, což je pro nás nevýhodou. Liposomy připravené ultrazvukovou sonifikací vykazují průměrně přibližně 65 % účinnost. Při porovnání výsledků u polysacharidových částic je patrné že makro a mikročástice jsou z hlediska enkapsulovaného množství polyfenolů vhodnější aplikační forma než nanočástice. Alginátové částice vykazují průměrnou enkapsulační účinnost 70 %. Pro přehlednost enkapsulovaného množství extraktu v mg na částici i na porci energetického nápoje, který by obsahoval 25 ml či g připravených částic do celkového objemu 250 ml základu, byla vytvořena *Tabulka 21* a *22*.

Tabulka 21: Enkapsulované množství polyfenolů v mg na 1g alginátových částic

Typ částic	Extrakty	Enkapsulované množství [mg/g]	Enkapsulované množství na porci [mg/ 25 g]
Alginátové	acai	0,11 ± 0,00	2,8
	acerola	8,66 ± 0,02	216,5
	maca	0,51 ± 0,01	12,8
	goji	2,02 ± 0,04	50,5
	ženšen	0,48 ± 0,01	11,8

Z *Tabulky 21* je patrné, nejvyšší podíl enkapsulovaných polyfenolů bylo v částicích aceroly a to 8,66 mg na 1 g částic. V částicích goji bylo enkapsulováno 2,02 mg polyfenolů na 1 g částic. V částicích macy a ženšenu bylo množství srovnatelné a to přibližně 0,50 mg na 1 g částic. Do částic acai se enkapsulovalo nejmenší množství polyfenolů s hodnotou pouze 0,11 mg na 1 g částic.

Tabulka 22: *Enkapsulované množství polyfenolů v mg na 1 ml liposomových částic*

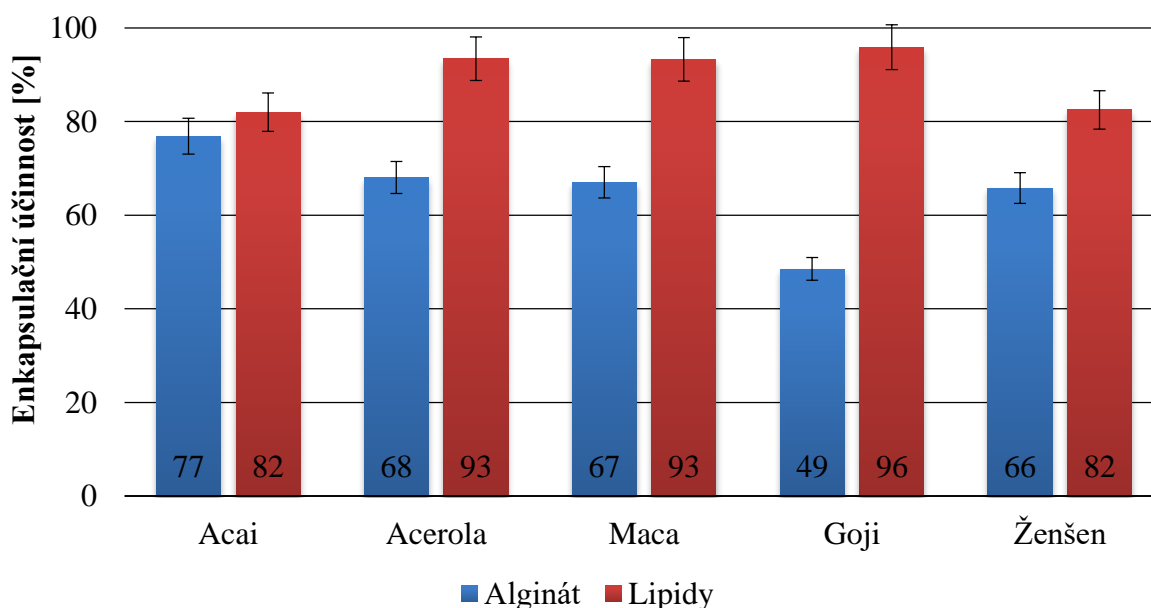
Typ částic	Extrakty	Enkapsulované množství [mg/ml]	Enkapsulované množství na porci [mg/ 25 ml]
Liposomové částice – ultrazvuk	acai	0,18 ± 0,00	4,4
	acerola	14,05 ± 0,32	351,3
	maca	4,72 ± 0,08	118,1
	goji	2,82 ± 0,04	70,5
	ženšen	0,57 ± 0,01	14,3
Liposomové částice – odpaření na tenké vrstvě	acai	1,32 ± 0,02	32,9
	acerola	15,73 ± 0,42	393,3
	maca	7,31 ± 0,13	182,7
	goji	2,03 ± 0,03	50,6
	ženšen	0,35 ± 0,01	8,9

Z Tabulky 22 je patrné, nejvyšší podíl enkapsulovaných polyfenolů bylo v částicích aceroly a to v obou případech v rozmezí 14-15 mg na 1 ml částic. V částicích macy bylo enkapsulováno 4,72 mg polyfenolů na 1 ml částic metodou sonifikace. Při odpaření na tenké vrstvě to bylo 7,31 mg polyfenolů na 1 ml částic. V částicích goji bylo při použití obou metod enkapsulováno přibližně stejné množství polyfenolů a to v rozmezí 2-2,8 mg na 1 ml částic. V částicích acai bylo metodou odpaření na tenké vrstvě enkapsulováno až 7x větší množství polyfenolů než metodou sonifikace. V částicích ženšenu bylo enkapsulované množství přibližně 0,35-0,57 mg polyfenolů na 1 ml částic.

Pro všechna další stanovení byly použity již pouze liposomové částice připraveny ultra sonifikací neboť právě tato metoda přípravy bude použita pro tvorbu liposomů do finálního energetického nápoje pro svou dobrou stabilitu. Ve všech následujících tabulkách proto bude uveden pouze jednotný název liposomy.

5.2.3.2 Enkapsulační účinnost antioxidantů

Enkapsulační účinnost připravených částic byla sledována rovněž pomocí stanovení antioxidační aktivity. Částice byly opět centrifugovány, supernatant byl slit a byla v něm změřena antioxidační aktivita, stejně jako v roztoku před enkapsulací. Z těchto dvou hodnot byla poté vypočítána enkapsulační účinnost antioxidantů dané metody. Pro každý vzorek bylo měření opakováno třikrát a ze získaných hodnot byl získán průměr. Rozptyl hodnot měření jednotlivých vzorků nebyl větší než 5 %.



Graf 5: Enkapsulační účinnost antioxidantů

Z grafu je patrné, že enkapsulační účinnost antioxidantů u liposomových částic byla efektivnější než u částic alginátových. U všech liposomových částic byla hodnota enkapsulační účinnosti nad 80 % což je velice dobrý výsledek. U částic alginátových byla účinnosti nad 60 % až na částice Goji kdy účinnost klesla pouze ke 49 %. Pro přesnost jsou tyto hodnoty znázorněny pro jednotlivé částice v *Tabulce 23* a *24*.

Tabulka 23: Enkapsulované množství antioxidantů v mg na 1 g částic a porci částic

Typ částic	Extrakty	Enkapsulované množství [mg/g]	Enkapsulované množství na porci [mg/ 25 g]
Alginátové	acai	1,7 ± 0,1	42
	acerola	3,2 ± 0,2	80
	maca	1,2 ± 0,0	28
	goji	2,7 ± 0,2	68
	ženšen	2,0 ± 0,1	50

Z *Tabulky 23* a *24* je patrné, že nejvyšší množství antioxidantů se enkapsulovalo do částic aceroly. Velice dobrých hodnot dosáhly také částice goji a ženšenu. Nejmenší množství antioxidantně aktivních látek se enkapsulovalo do alginátových částic acai a liposomových částic macy.

Tabulka 24: *Enkapsulované množství antioxidantů v mg na 1 ml částic a porci částic*

Typ částic	Extrakty	Enkapsulované množství [mg/ml]	Enkapsulované množství na porci [mg/ 25 ml]
Liposomy	acai	1,8 ± 0,1	45
	acerola	4,4 ± 0,2	110
	maca	1,7 ± 0,1	43
	goji	3,3 ± 0,2	81
	ženšen	2,5 ± 0,1	63

Na základě výsledku z *Tabulek 23 a 24* se také nabízí srovnání hodnot antioxidační aktivity s množstvím polyfenolů v jednotlivých částicích. Můžeme tak porovnávat jednotlivá množství mezi sebou či jednotlivé částice.

Tabulka 25: *Vliv konc. polyfenolů v alginátových částicích na jejich antioxidační aktivitu*

Typ částic	Extrakty	Enkapsulované množství [mg/25 g]	
		Polyfenoly	Antioxidační aktivita
Alginátové	acai	2,8	42
	acerola	216,5	80
	maca	12,8	28
	goji	50,5	68
	ženšen	11,8	50

Z *Tabulky 25* můžeme vidět, že enkapsulované množství polyfenolů poměrově odpovídá enkapsulovanému množství antioxidantů. Čím více polyfenolů bylo v dané částici, tím vyšší antioxidační aktivitu částice vykazovaly.

Tabulka 26: *Vliv koncentrace polyfenolů v liposomech na jejich antioxidační aktivitu*

Typ částic	Extrakty	Enkapsulované množství [mg/25 ml]	
		Polyfenoly	Antioxidační aktivita
Liposomy	acai	4,4	45
	acerola	351,3	110
	maca	118,1	43
	goji	70,5	81
	ženšen	14,3	63

Z *Tabulky 26* můžeme vidět, že antioxidační aktivita v liposomech je vyšší než v alginátových částicích. Toto souvisí se skutečností, že se do 1 ml liposomových částic enkapsuluje více polyfenolu než do 1 g alginátových částic. Velice dobrých hodnot zde dosahovaly například částice Macy či Goji, které v alginátových částicích takto dobré výsledky neměly.

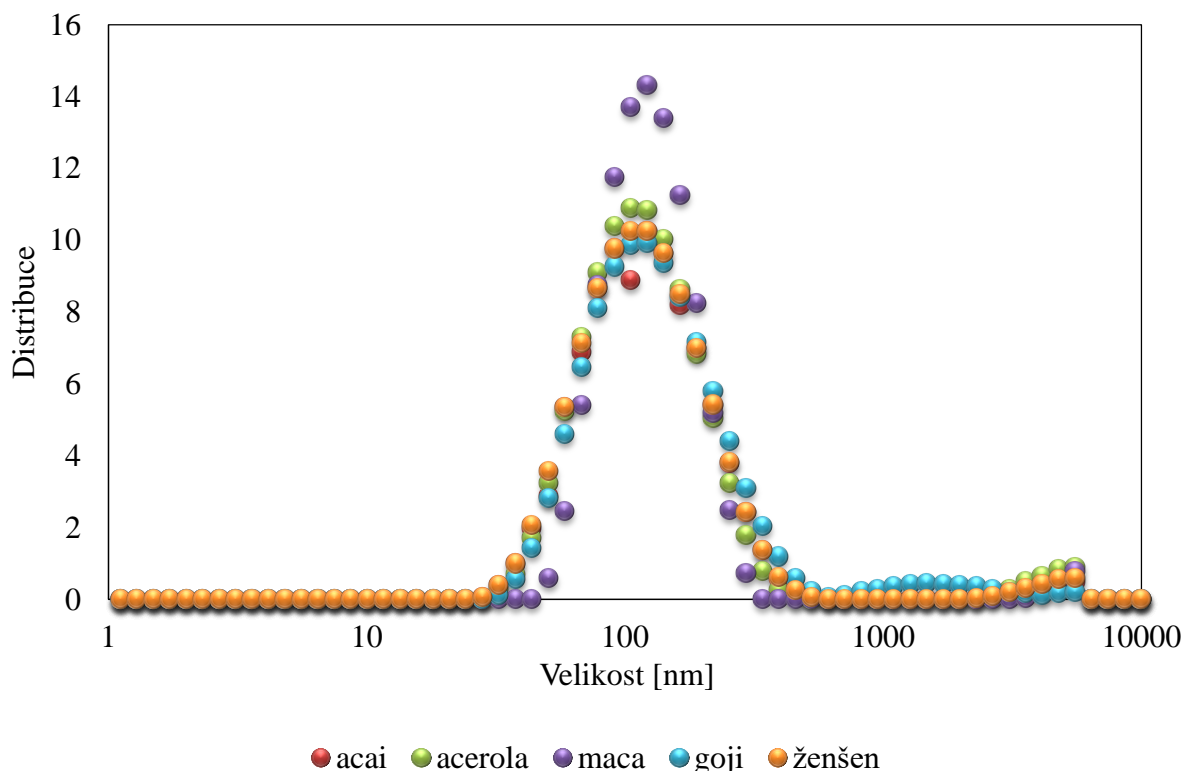
5.2.3.3 Stanovení velikosti a stability částic pomocí DLS

V této práci byly nanočástice analyzovány na koloidním analyzátoru Malvern Zetasizer Nano ZS, který nám umožnil proměřit základní data jako distribuce velikosti částic, průměrná velikost částic a index polydisperzity.

Tabulka 27: Velikost, polydisperzita a zeta potenciál čestvých liposomů

Částice	Průměrná velikost (nm)	Polydisperzita	Zeta potenciál (mV)
Acai	$101,1 \pm 0,9$	$0,20 \pm 0,01$	$-41,6 \pm 0,5$
acerola	$87,7 \pm 2,2$	$0,45 \pm 0,08$	$-45,4 \pm 0,6$
maca	$201,8 \pm 7,2$	$0,68 \pm 0,32$	$-46,5 \pm 1,6$
goji	$136,2 \pm 0,2$	$0,33 \pm 0,02$	$-46,1 \pm 3,1$
ženšen	$104,4 \pm 0,3$	$0,24 \pm 0,00$	$-36,9 \pm 1,6$

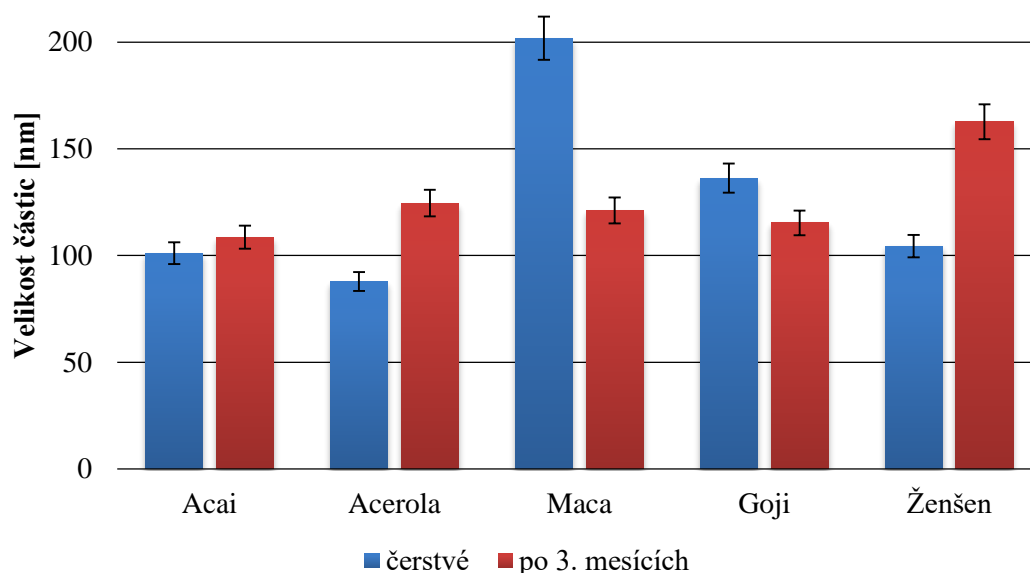
Zeta potenciál připravených liposomů byl ve všech případech v rozmezí od -30 mV do -60 mV. Obecně lze tedy říci, že všechny připravené liposomové částice byly stabilní. Rovněž z hlediska velikosti, která se pohybovala v průměru mezi 100 a 200 nm, vyhovovaly částici aplikaci do nápojů.



Graf 6: Graf znázorňující velikost a distribuci připravných liposomových částic s enkapsulovaným extraktem

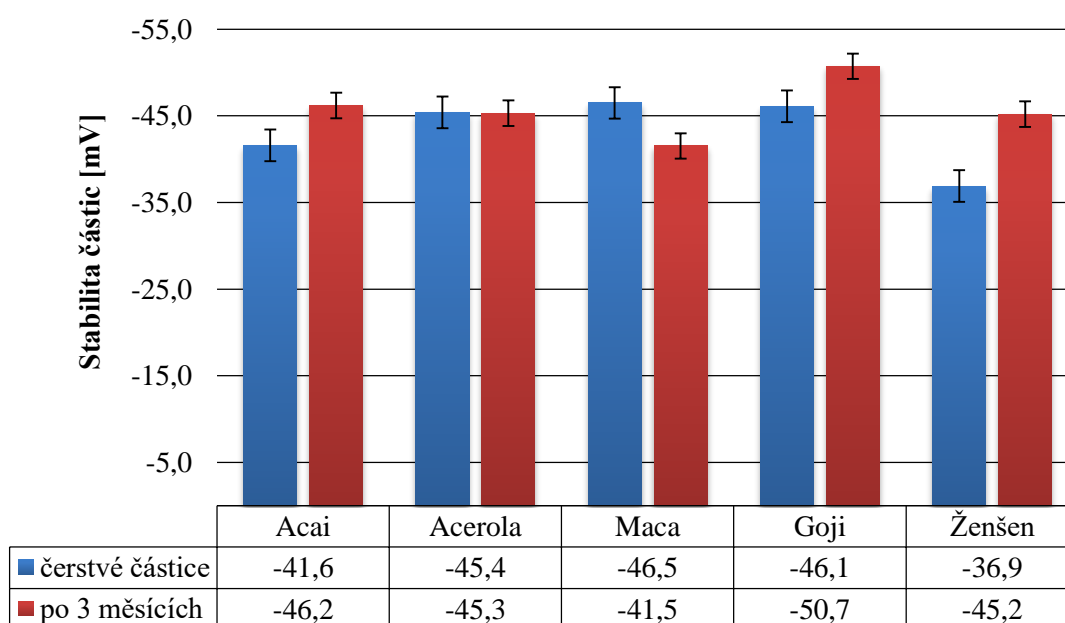
5.2.3.4 Dlouhodobá stabilita částic

Všechny připravené částice s enkapsulovanou složkou byly dále podrobeny analýze dlouhodobé stability. Pro zjištění dlouhodobé stability liposomových a alginátových částic byly tyto částice po přípravě a charakterizaci uchovány ve vodném prostředí po dobu 3 měsíců ve tmě a při teplotě okolo 5 °C. Poté bylo u všech částic stanoveno množství uvolněných enkapsulovaných složek. U liposomových částic byla rovněž sledována změna jejich velikosti a stability z hlediska zeta potenciálu.



Graf 7: Graf znázorňující velikost liposomových částic

Z grafu je patrné, že velikost částic se po dobu 3 měsíců nijak markantně nezměnila a částice si tak zachovaly svůj původní tvar. U částic macy došlo k mírnému zmenšení a u částic ženšenu ke zvětšení z důvodu agregace částic.



Graf 8: Stabilita enkapsulovaných liposomových částic

Všechny připravené liposomové částice vykazují dobrou stabilitu i po 3. měsících. Z tohoto grafu můžeme usuzovat, že liposomy byly připraveny vhodnou metodou a jejich stabilita je přijatelná vzhledem k jejich plánovanému použití.

Množství uvolněných enkapsulovaných složek po 3. měsíčním skladování bylo sledováno pomocí stanovení uvolněných polyfenolů.

Tabulka 28: Procentuální uvolnění polyfenolů z alginátových částic po 3. měsících

Typ částic	Extrakty	enkapsulované množství polyfenolů po 3. měsících [mg/g]	Procentuální uvolnění polyfenolů z částic po 3. měsících [%]
Alginátové	acai	0,01 ± 0,00	94 ± 1,7
	acerola	0,48 ± 0,01	94 ± 3,2
	maca	0,01 ± 0,00	99 ± 2,1
	goji	0,42 ± 0,01	79 ± 1,1
	ženšen	0,20 ± 0,00	58 ± 0,8

Z výše uvedené *Tabulky 28* je patrné, že alginátové částice nejsou vhodné pro dlouhodobé uchovávání ve vodných roztocích. Z částic se v průběhu skladování ve vodném prostředí uvolnilo po třech měsících takřka veškeré množství enkapsulovaných polyfenolů. Tyto částice je nutné dlouhodobě uchovávat mimo budoucí nápoje. Aplikace částic do nápoje lze provést až těsně před požitím, například formou bubble tea.

Tabulka 29: Procentuální uvolnění polyfenolů z liposomových částic po 3. měsících

Typ částic	Extrakty	enkapsulované množství polyfenolů po 3. měsících [mg/ml]	Procentuální uvolnění polyfenolů z částic po 3. měsících [%]
Liposomy	acai	0,18 ± 0,01	12 ± 0,2
	acerola	14,05 ± 0,32	15 ± 0,2
	maca	3,33 ± 0,03	30 ± 0,4
	goji	2,82 ± 0,02	5 ± 0,1
	ženšen	0,58 ± 0,01	5 ± 0,1

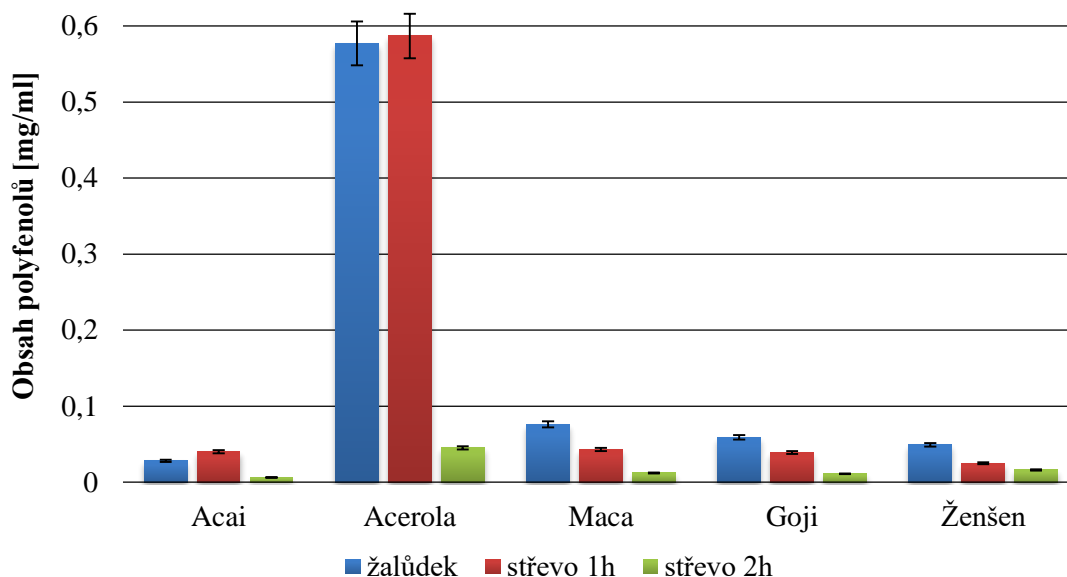
Liposomové částice jsou naopak velice vhodné pro dlouhodobé uchovávání polyfenolů, jelikož procentuální ztráta u nich nebyla tak markantní. Po třech měsících skladování ve vodném prostředí se uvolnilo pouze 5-30 % enkapsulovaného množství polyfenolů. Tyto částice lze tedy přímo aplikovat do budoucího energetického nápoje například v plechovkách.

5.2.3.5 Trávení

Připravené částice s enkapsulovanou složkou byly také podrobeny analýze stability v modelovém fyziologickém prostředí. Simulováno bylo modelové trávení. Částice byly přidány do modelových trávicích šťáv a inkubovány při teplotě 37 °C. Ve stanovených časech byly provedeny odběry roztoků pro stanovení obsahu uvolněných složek. Pomocí spektrofotometrických metod bylo měřeno množství uvolnění celkových polyfenolů.

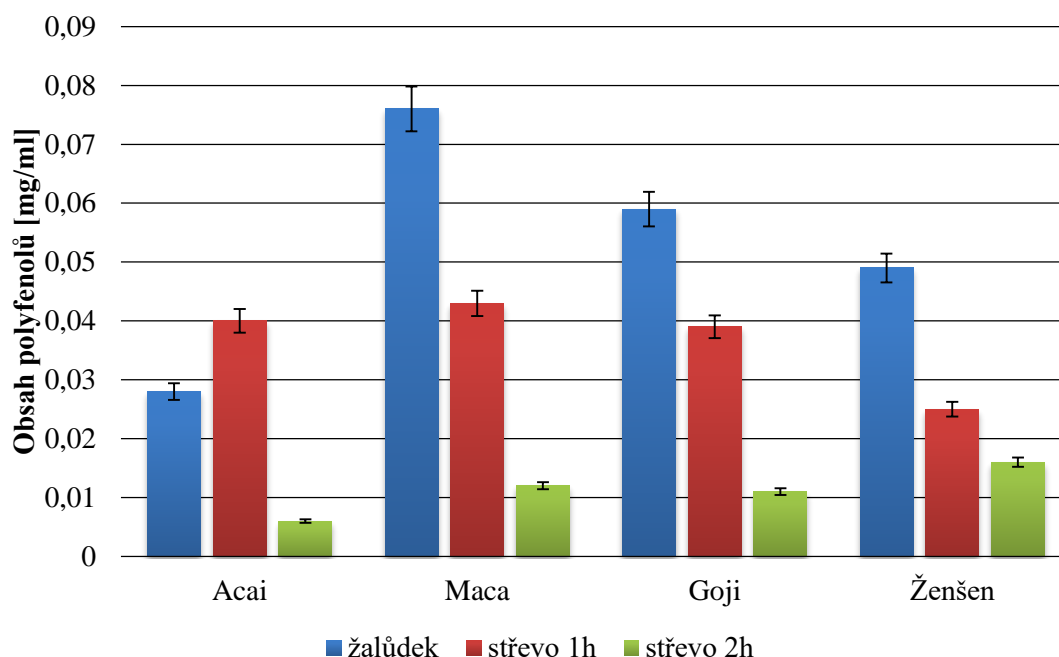
a) Alginátové částice

Připravené alginátové částice s enkapsulovaným bylinným či ovocným extraktem byly přidány do modelových trávicích šťáv a pomocí spektrofotometrické metody bylo měřeno množství uvolnění celkových polyfenolů. V žaludeční šťávě byly částice ponechány 45 minut, ve střevní šťávě (pankreatické a žlučové šťávě) byly částic inkubovány po dobu 120 minut. Přesný postup stanovení je uveden v kapitole 4.12. V *Grafech 9 a 10* jsou zaznamenány hodnoty uvolněných množství polyfenolů v průběhu trávení.



Graf 9: Množství uvolněných polyfenolů v průběhu modelového trávení alginátových částic

Vzhledem k vysokým hodnotám u částic Aceroly v žaludku a střevě byl vytvořen nový graf znázorňující detailnější hodnoty částic Acai, Macy, Goji a Ženšenu s nižšími hodnotami.

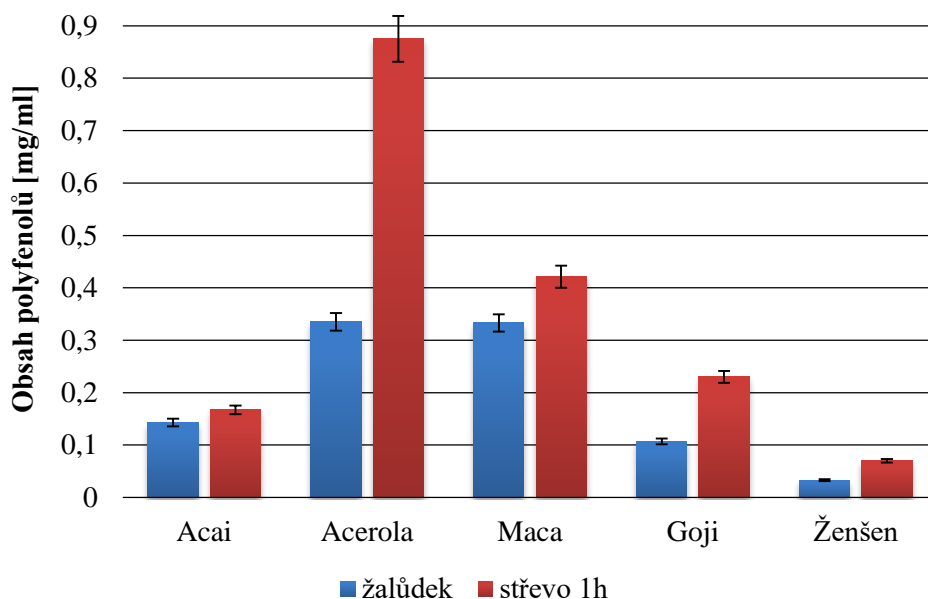


Graf 10: Množství uvolněných polyfenolů v průběhu modelového trávení alginátových částic

Z Grafu je patrné, že největší uvolnění polyfenolů bylo v žaludku, poměrná část ale zůstala ochráněna a byla uvolněna díky enkapsulaci až ve střevě působením pankreatických a žlučových šťáv. U částic Aceroly, Macy, Goji a Ženšenu docházelo nejvýraznějšímu uvolnění působením žaludeční šťávy, stejně velké množství bylo uvolněno i působením střevní šťávy. Oproti tomu působením žaludeční šťávy u částic Acai došlo k uvolnění 0,028 mg polyfenolů, působením střevní šťávy došlo k uvolnění dalších 0,04 mg polyfenolů a po dvou hodinovém pobytu ve střevní šťávě se uvolnilo zbývající množství 0,006 mg polyfenolů a trávení bylo ukončeno.

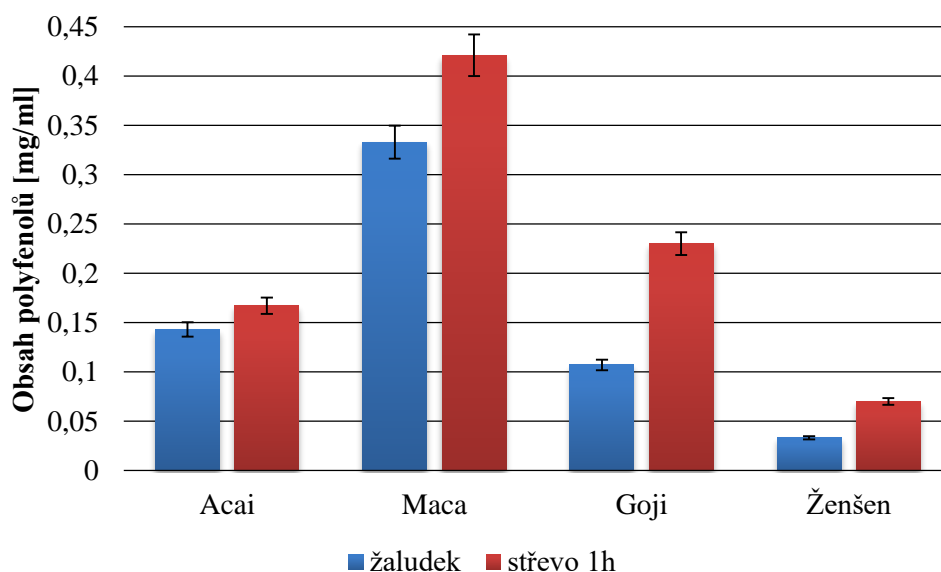
b) Liposomy

Také liposomové částice s enkapsulovaným bylinným či ovocným extraktem byly přidány do modelových trávicích šťáv a ve stanovených časech byly prováděny odběry pro stanovení obsahu uvolněných složek. V žaludeční šťávě byly částice ponechány 45 minut, ve střevní šťávě byly částice inkubovány po dobu 60 minut. Přesný postup stanovení je uveden v kapitole 4.12. Grafické znázornění uvolněného množství polyfenolů během trávení je uvedeno v *Grafech 11 a 12*.



Graf 11: *Množství uvolněných polyfenolů v průběhu modelového trávení liposomových částic*

Vzhledem k vysokým hodnotám u částic Aceroly ve střevě byl vytvořen nový graf znázorňující detailnější hodnoty částic Acai, Macy, Goji a Ženšenu s nižšími hodnotami.



Graf 12: *Množství uvolněných polyfenolů v průběhu modelového trávení liposomových částic*

Z takto naměřených a graficky znázorněných hodnot můžeme usuzovat, že enkapsulované extrakty byly chráněny svým obalem před negativními vlivy žaludečních šťáv a po úpravě na pH = 9 a přidání žlučové a pankreatické šťávy došlo k největšímu uvolnění polyfenolů. Pokud bychom extrakty neenkapsulovali a nechali je volně v roztoku, došlo by v žaludku k částečné degradaci a snížili bychom tak blahodárný vliv polyfenolů na naše tělo. Po 1 hodině trávení však došlo k degradaci částic a další hodnoty již měřeny nebyly. Například u částic Aceroly došlo v žaludku k uvolnění 0,34 mg polyfenolů, působením střevní šťávy došlo k uvolnění

dalších 0,88 mg polyfenolů a trávení bylo ukončeno. U všech liposomových částic bylo větší množství uvolněno působením střevní šťávy.

5.2.4 Návrh energetického nápoje

Jako návrh liposomových částic byly použité prázdné částice lecitinu, které mají neutrální chuť. Dalším návrhem byly alginátové částice. Jak liposomové tak alginátové částice byly podávány samostatně či ve vzájemných kombinacích. Pro vhodný návrh kombinací a částic byla připravena senzorická analýza, kde jsme hledali nejvhodnější částice a základ energetického nápoje z hlediska vzhledu a barvy, vůně, konzistence či celkového hodnocení.



Obrázek 10: Ukázka alginátových částic Goji pro vzorek č.1

V následující tabulce můžeme vidět množství enkapsulovaných polyfenolů či antioxidační aktivity v jednotlivých částicích připravených k senzorické analýze.

Tabulka 30: Alginátové částice k senzorické analýze

Vzorek	Částice	Polyfenoly [mg/g]	Antioxidační aktivita[mg/g]
1	Acai	0,11 ± 0,00	1,7 ± 0,1
2	Acerola	8,66 ± 0,02	3,2 ± 0,2
3	Maca	0,51 ± 0,01	1,2 ± 0,0
4	Goji	2,02 ± 0,04	2,7 ± 0,2
5	Ženšen	0,48 ± 0,01	2,0 ± 0,1

V následující tabulce můžeme vidět množství kofeinu v jednotlivých čajových základech, které byly připraveny podle návodu na obale a následně byly oslazeny Stévií v poměru 2,5 g na 250 ml nápoje.

Tabulka 31: *Koncentrace kofeinu v čajových základech k senzorické analýze*

Vzorek	Základ	Koncentrace ve 250 ml nápoje [mg/250ml]
1	Bílý čaj	113 ± 0,1
2	Černý čaj	140 ± 0,1
3	Matcha tea	91 ± 0,1
4	Zelený čaj	93 ± 0,1

V následující tabulce můžeme vidět množství enkapsulovaných polyfenolů či antioxidační aktivity v jednotlivých kombinacích připravených k senzorické analýze. Lecitinové částice zde byly pouze pro zjištění, zda respondentům nebude vadit jejich chuť či zákal, který v nápoji způsobí.

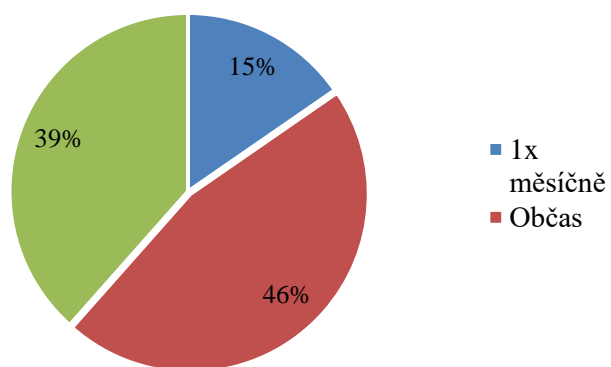
Tabulka 32: *Kombinace částic k senzorické analýze*

Vzorek	Částice	Polyfenoly [mg/g]	Antioxidační aktivita[mg/g]
1	Goji	0,11	2,70
2	Goji, Acerola, Acai	10,79	7,58
3	Lecitin	-	–
4	Lecitin, Goji	0,13	2,70
5	Ženšen, Maca	0,98	3,13

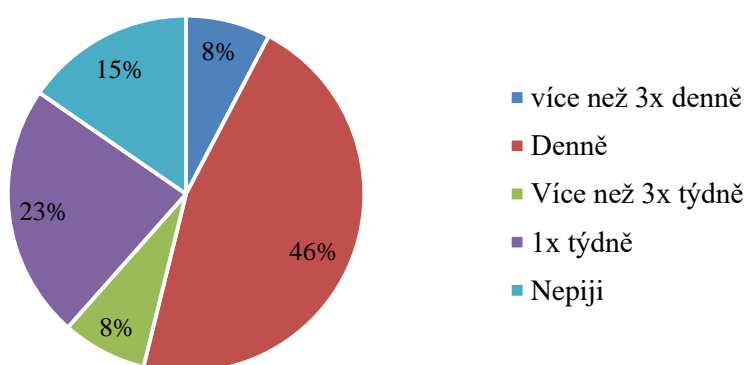
5.3 Senzorická analýza

Senzorickou analýzou rozumíme hodnocení potravin, při kterém se organoleptické vlastnosti poživatin stanoví bezprostředně našimi smysly (chutí, čichem zrakem, hmatem a sluchem), včetně zpracování výsledků centrálním nervovým systémem. Analýza probíhá za takových podmínek, kdy je zajištěno objektivní, přesné a reprodukovatelné měření. Senzorickou analýzou se nestanoví přímo koncentraci senzoricky aktivní látky, ale přijatelnost nebo intenzita vjemu, nikoli složení potravin.

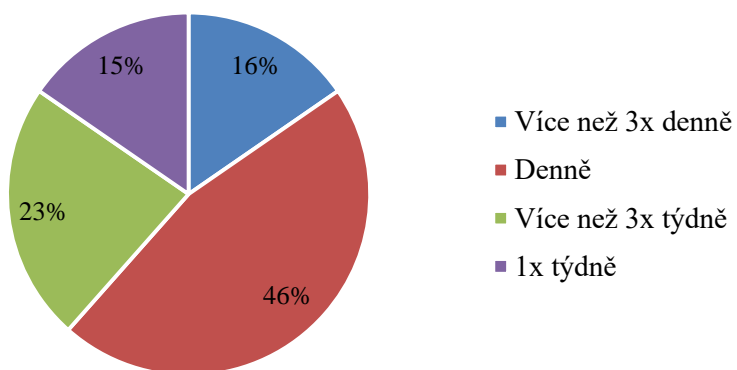
Vzorky čajových základu, částic a jednotlivých kombinací hodnotilo 13 proškolených vysokoškolských hodnotitelů. Zhruba polovina z nich konzumuje energetické nápoje občas, nebo vůbec a pouze 15 % respondentů konzumuje energetické nápoje 1x měsíčně. Většina hodnotitelů konzumuje kávu denně. Stanovisko posuzovatelů k energetickým drinkům, čaji a kávě před ochutnáváním je znázorněno na v *Grafech 13, 14 a 15*.



Graf 13: Četnost konzumace energetických nápojů



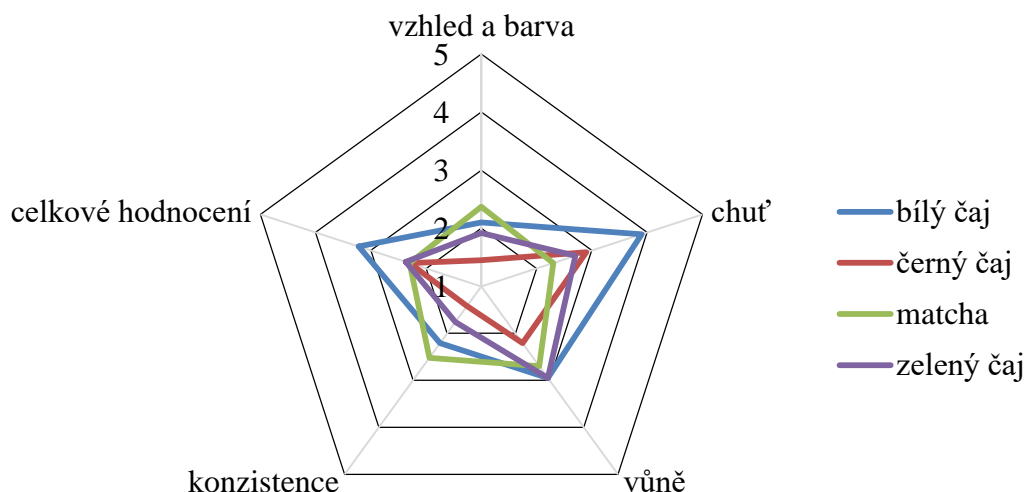
Graf 14: Četnost konzumace kávy



Graf 15: Četnost konzumace čaje

5.3.1 Senzorické zhodnocení základu drinku

Výsledky jsou znázorněny graficky pomocí hvězdicovitého grafu, kdy hodnota 1 byla nejlepší, v grafu zaznamenána ve středu hvězdice a hodnota 5 nejhorší, nejméně přijatelná, v grafu jako okrajová hodnota. Ze všech známek byl udělán aritmetický průměr.



Graf 16: Senzorické zhodnocení čajových základů energetického nápoje

Z dosažených výsledků vyplývá, že z hlediska vzhledu a barvy byl nejlépe hodnocen černý čaj s průměrnou známkou 1,5. Se známkou 1,92 byl na druhém místě zelený čaj, na místě třetím byl čaj bílý s průměrnou známkou 2,1 a na místě posledním pak matcha se známkou 2,37. Důvodem proč čaj matcha hodnotitelům nevyhovoval, byla jeho výrazná jednoznačně sytě zelená barva. Někteří respondenti uvedli, že na první pohled mají z této barvy strach. Matcha jako taková je na trhu pouze krátce tudíž že můžeme domnívat, že i to sehrálo svou roli ve vizuálním hodnocení.

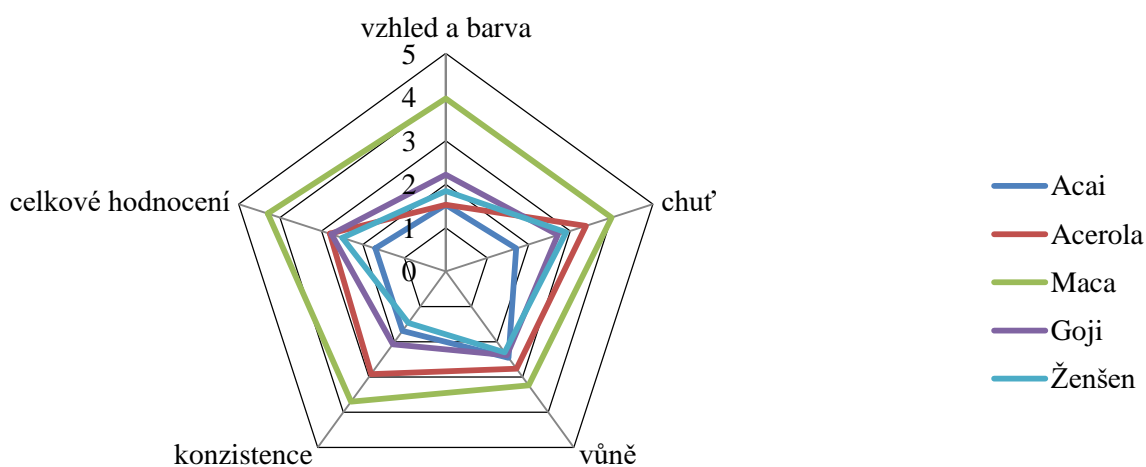
Dalším hodnotícím parametrem byla chuť základu. Zde matcha čaj obdržel naopak nejlepší hodnocení a to u všech věkových kategorií. Průměrné hodnocení bylo 2,3. Na místě druhém byl zelený čaj s hodnotou 2,7. Na místě třetím čaj černý s průměrnou známkou 2,9 a na místě posledním čaj bílý. U tohoto hodnocení musíme brát v potaz subjektivní hodnocení uživatelů, jelikož někteří u stejného základu uvedli „příliš přeslazená chuť“ a jiní zase „neuškodilo by přidat více cukru či jiného sladidla“. Sladká chuť byla přijatelná pro respondenty, kteří pijí občas energetické nápoje a občas pijí čaj. Pro respondenty, kteří pijí denně čaje a energetické nápoje nepijí vůbec, byla chuť čajových základů příliš přeslazená. Třetím parametrem byla vůně čajového základu. Zde získal nejlepší hodnocení čaj černý, který má velice příjemné aroma a průměrná známka byla 2,2. Na místě druhém byla matcha s průměrnou známkou 2,7. Na místě 3 a 4 se stejným hodnocením byl čaj bílý a zelený s průměrnou známkou 2,9. Posledním hodnotícím faktorem byla konzistence základu. Zde se umístil nejlépe čaj černý s průměrnou známkou 1,42. Toto hodnocení získal hlavně díky tomu, že jako jediný nejevil žádné známky zákalu. U čaje zeleného byl mírný zákal, který je pro silný zelený čaj typický. U čaje bílého byl zákal znatelnější. Na místě druhém byl čaj zelený se známkou 1,76. Místo třetí měl čaj bílý se známkou 2,21 a na posledním místě byla matcha se známkou 2,52 díky

svému zákalu, který je ale naprosto v pořádku co se týče přípravy tohoto základu, nejedná se o čajový výluh nýbrž o drcené lístky zeleného čaje, které je možno připravit buďto vodou o teplotě 80 °C či vodou studenou.

Jako poslední hodnocení u základu měli respondenti uvést celkové zhodnocení daného základu. Zde se černý čaj, matcha a zelený čaj dostaly na přibližně stejnou hodnotu a jako jediný nevyhovoval čaj bílý. Důvodem špatného hodnocení byla především trpká a hořká chuť bílého čaje.

5.3.2 Senzorické zhodnocení připravených alginátových částic

Výsledky jsou znázorněny graficky pomocí hvězdicovitého grafu, kdy hodnota 1 byla nejlepší, v grafu zaznamenána ve středu hvězdice a hodnota 5 nejhorší, nejméně přijatelná, v grafu jako okrajová hodnota. Ze všech známek byl udělán aritmetický průměr.



Graf 17: Senzorické zhodnocení alginátových částic

Z grafu můžeme vyčíst, že co se týče vzhledové stránky, tak nejlépe vyhovovaly nejbarevnější částice acai a aceroly s průměrnou známkou 1,53. Ihned za nimi byly v hodnocení částice ženšenu a goji. Na místě poslední byly částice macy s průměrnou známkou 3,94. Důvodem takto špatného hodnocení byla bledá okrová barva kořene macy. Takto barevně nevzhledné částice je tak lepší schovat do menších liposomových částic.

Jako další hodnotící parametr byla chuť. Zde opět nejlepší hodnocení získaly částice acai s průměrnou hodnotou 1,7. Na druhém a třetím místě se umístily částice goji a ženšenu pro svou nasládlou chuť. Čtvrté místo získaly částice aceroly, které byly výborné po vzhledové a barevné stránce. Chuťově však nevyhovovaly pro svou velice kyselou chuť, kterou zapříčiňuje vysoký obsah vitamínu C v plodech aceroly. Na posledním místě byly opět částice macy. Po chuťové stránce tedy dali respondenti přednost neutrálním či lehce sladkým částicím. Třetím parametrem byla vůně částic. Zde získaly nejlepší hodnocení částice acai, goji a ženšenu s průměrnou známkou přibližně 2,4. Na místě čtvrtém byly částice aceroly s pronikavou vůní po citróněch. Na místě posledním částice macy, které měly lehce nepříjemný zápach.

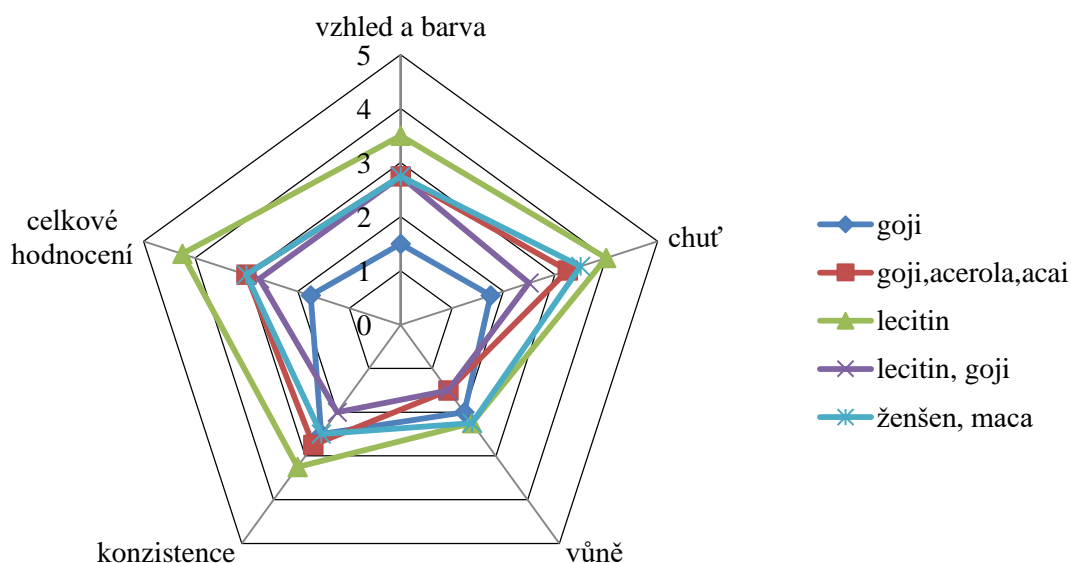
Posledním hodnotícím faktorem byla konzistence připravených alginátových částic. Zde nejlepší hodnocení získaly částice ženšenu, které byly na pohled hezky symetrické a pevné, další v pořadí byly částice acai, goji, aceroly a macy.

V celkovém hodnocení nejlépe obstály částice acai, které byly atraktivní svým tmavším vzhledem, zajímavou chutí a pravidelností částic. Druhé v pořadí byly částice aceroly, goji a ženšenu, které získaly od respondentů podobné hodnocení. Tyto částice byly atraktivní jak chutí, tak vzhledem. Na posledním místě byly částice macy, které nevyhovovaly ve všech parametrech.

5.3.3 Senzorické zhodnocení připravených kombinací částic se zvoleným základem

V tomto hodnocení si každý z hodnotitelů vybral svůj základ energetického nápoje podle předešlé ochutnávky a hodnocení. Do zvoleného základu bylo přimícháno 5 druhů kombinací částic. V prvním vzorku byly alginátové částice s goji, vzorek druhý obsahoval kombinaci alginátových částic acai, aceroly a goji. Třetí vzorek byl čajový základ obohacený o liposomové částice z lecitinu. Vzorek číslo 4 obsahoval alginátové částice s goji a liposomové částice. Pátým vzorkem byly alginátové částice ženšenu a macy. Na základě takto vytvořených kombinací poté měli sestavit stupnici pořadového testu.

a) Zvolený základ: černý čaj

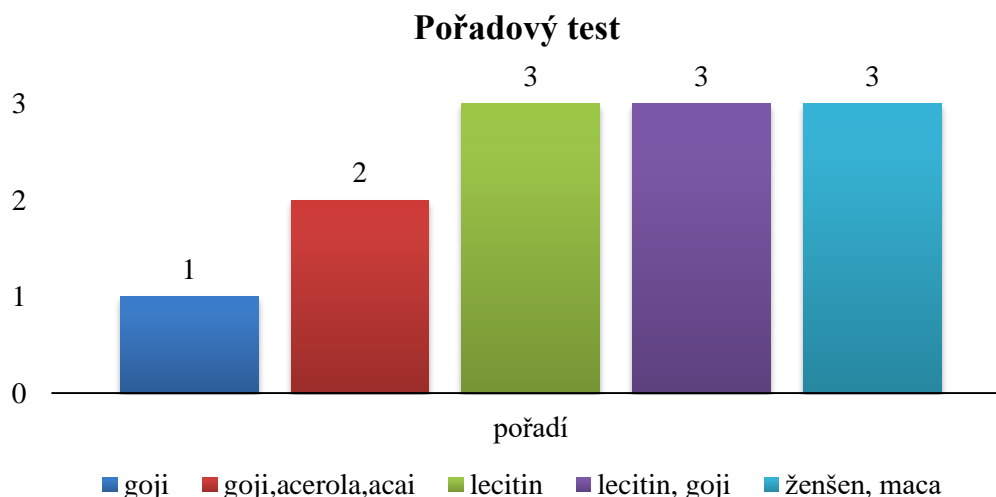


Graf 18: Senzorické zhodnocení kombinací s černým čajem

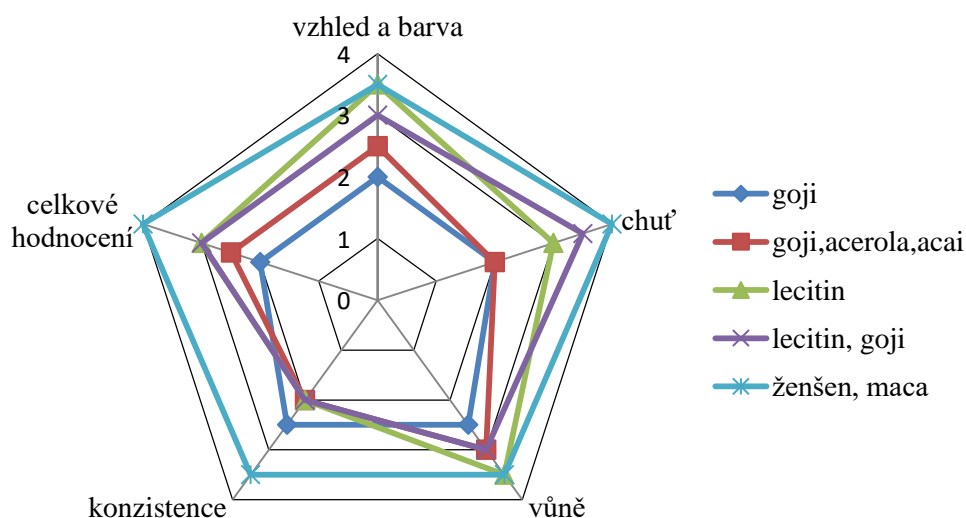
Z celkového počtu 13 si 4 hodnotící vybrali jako základ černý čaj. U jednotlivých kombinací byly nejhůře hodnoceny samotné liposomové částice hlavně zřejmě pro svou neatraktivní chuť a vzniklý zákal. Liposomové částice respondenty nezaujaly. Částice vytvořily znatelný zákal nápoje, zajímavým zjištěním však bylo především to, že někteří hodnotitelé se domnívali, že nápoj žádné částice neobsahuje.

Nejlépe v hodnocení dopadla kombinace černého čaje s částicemi goji. Druhé místo pak zaujala kombinace částic goji a liposomových částic. V kombinaci s jinými částicemi tedy nebyly liposomové částice hodnoceny negativně.

Na třetím místě se umístila kombinace 3 alginátových částic acai, aceroly a goji. Tento vzorek byl hodnocen negativně hlavně z hlediska konzistence a chuti. Respondenti do poznámek uvedli, že jednotlivé částice nemohly vyniknout svou chutí, neboť bylo smícháno moc druhů částic do jednoho nápoje. Velice pozitivní výsledek přinesla kombinace atraktivních částic ženšenu a zcela neatraktivních částic macy. Po vzhledové stránce se tato kombinace vyrovnala ostatním částicím i vůně byla lépe hodnocena než při hodnocení samotných částic macy.



b) Zvolený základ: matcha tea

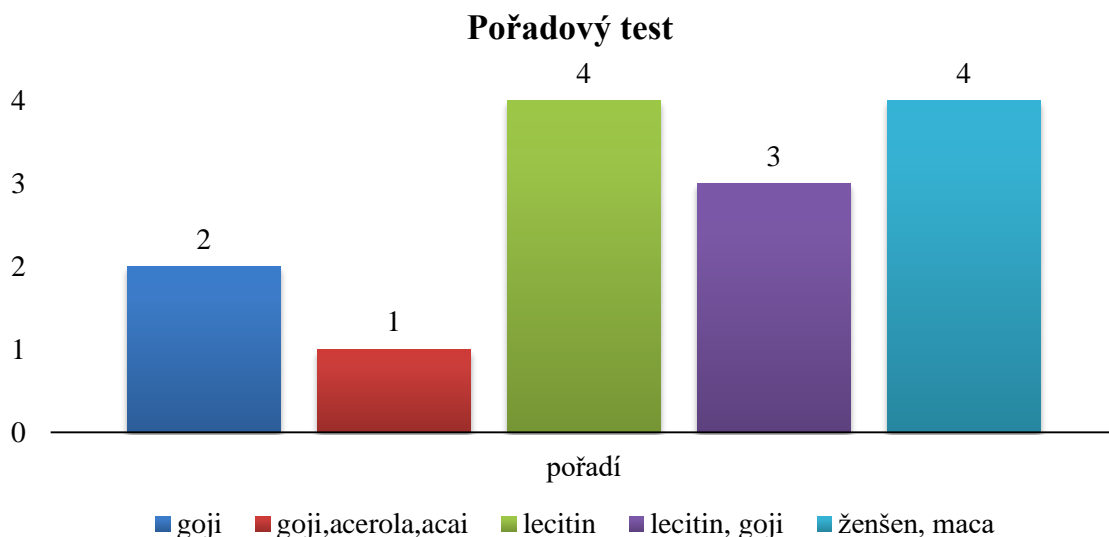


Graf 19: Senzorické zhodnocení kombinací s matcha tea

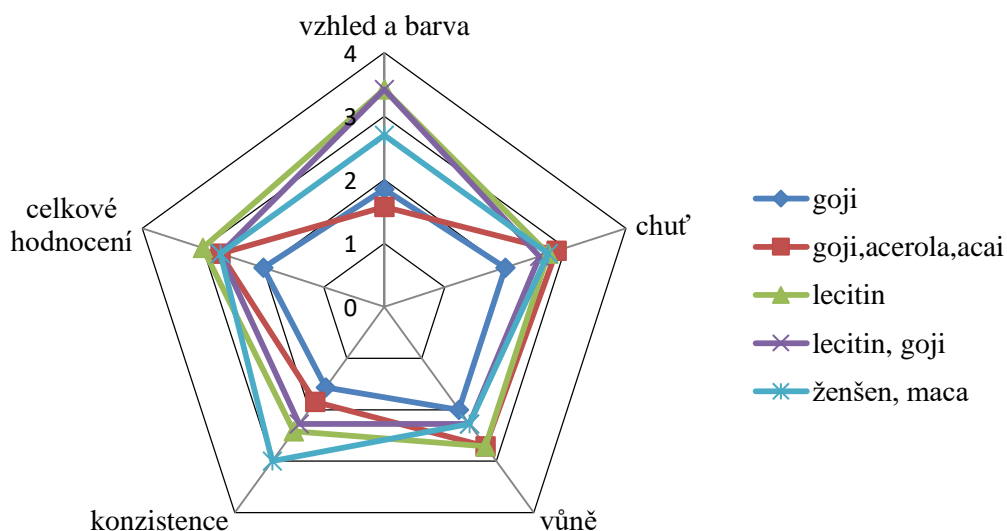
Z celkového počtu 13 si 2 hodnotící vybrali jako základ matchu. Ve kterém se nejlépe osvědčila také kombinace pouze s jedním typem částic a to goji. Po chuťové stránce však byla kombinace goji i 3 alginátových částic (goji, acerola, acai) hodnocena velice dobře. Druhé místo obsadily liposomy za nimi pak v pořadí byly alginátové částice s goji v kombinaci s liposomy a na místě posledním kombinace alginátových částic ženšenu a macy. Co se týče vůně tak hodnocení všech vzorků dopadlo velice obdobně.

U konzistence byly dobře hodnoceny především liposomové částice, liposomové částice v kombinaci s alginátovými částicemi s goji a také kombinace částic acai, aceroly a goji. Matcha je tedy díky své konzistenci vynikající volbou pro aplikace liposomových částic. Na dalším místě byly samotné částice goji a na místě posledním opět částice ženšenu s částicemi macy.

V celkovém hodnocení byly vzorky hodnoceny sestupně v obdobném pořadí, tedy goji, kombinace acai s acerolou a goji, liposomy, kombinace goji s liposomy a na místě posledním ženšen a maca.



c) Zvolený základ: Zelený čaj

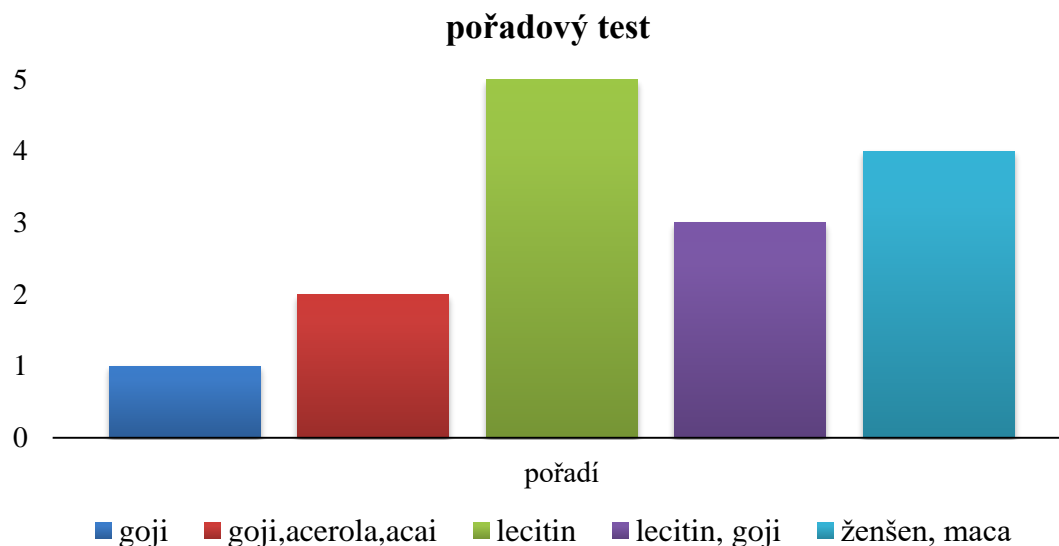


Graf 20: Senzorické zhodnocení kombinací se zeleným čajem

Z celkového počtu 13 si 7 hodnotících vybralo jako základ zelený čaj. Zde se rovněž osvědčila kombinace pouze s jedním typem alginátových částic. Vzhledově však nejlepší hodnocení získala kombinace 3 druhů částic: acai, acerola a goji s celkovou známkou 1,57. Druhá v pořadí byla kombinace s částicemi goji s celkovou známkou 1,85.

Na místě třetím byly alginátové částice macy a ženšenu s průměrnou známkou 2,7. Nejhorší dopadly částice obsahující samotné liposomové částice a liposomové částice v kombinaci s alginátovými částicemi goji. Chuťově se nejhorší osvědčily samotné alginátové částice goji s průměrnou známkou 2. Všechny ostatní kombinace částic v kombinaci se zeleným čajem byly hodnoceny velmi podobně a známky se pohybovaly v rozmezí 2,5 - 2,7. Vůně částic byla nejhorší hodnocena opět u samotných alginátových částic goji s celkovým hodnocením 2. Nejhorší nedopadly ani liposomové částice s alginátovými částicemi s goji či částice ženšenu s macou. Nejhorší byly hodnoceny samotné liposomové částice a kombinace 3 alginátových částic, které získaly hodnocení 2,71. Konzistence byla nejlepší opět u samotných alginátových částic s goji či u kombinace 3 alginátových částic acai, aceroly a goji. Následovaly kombinace obsahující liposomy a na posledním místě byla kombinace alginátových částic s obsahem ženšenu a macy.

V celkovém hodnocení dopadly nejhorší částice s goji s celkovým hodnocením 2 a nejhorší liposomové částice s celkovým hodnocením 3. Všechny ostatní kombinace byly hodnoceny stejně s výslednou známkou 2,7.



Závěrem lze říci, že většinu částic je nejvhodnější aplikovat do nápoje jednotlivě. V případě aplikace liposomových částic a alginátových částic s obsahem macy, které z hlediska sensorického hodnocení nevyhovovaly. Je však naopak nutné skombinovat tyto částice s dalšími částicemi, které zamaskují jejich nevyhovující sensorické parametry. K zamaskování nevyhovující chuti a zákalu liposomových částic je také vhodné využít jako základ čaj Matcha.

5.4 Finální obohacený energetický nápoj

Na základě námi připravených kombinací k senzorické analýze byl vybrán jako finální energetický nápoj se základem z černého či zeleného čaje s alginátovými částicemi Acai, Goji či Ženšenu. Všechny tyto nápoje by byly obohaceny o liposomy s enkapsulovaným extraktem Aceroly, která byla pro některé hodnotitele příliš kyselá v alginátových částicích, proto můžeme tuto kyselost schovat do liposomu, ale zachovat tak vysoký obsah polyfenolů, vitamínu C a s tím související antioxidační aktivitu s pozvolně uvolňujícím se účinkem. V jednotlivých tabulkách uvedených níže je možno vidět přínosy jednotlivých čajových základů a extraktu co se týče obsahu polyfenolu, flavonoidu, vitamínu, kofeinu či antioxidační aktivity.

Energetické nápoje s obsahem liposomových částic by se uchovávaly přímo v plechovkách či jiných nádobách. Extrakty z liposomových částic se neuvolňovaly do prostředí tak markantně jako alginátové částice, které by se musely ochovávat před použitím ve vlhčeném prostředí vakuově zabalené aby tak nedocházelo k jejich vysychání.

Tabulka 33: Návrh základu finálního energetického nápoje

Zvolený základ	Celkový obsah jednotlivých složek na porci [mg·250 ml ⁻¹]			
	Polyfenoly	Flavonoidy	Kofein	Antioxidační aktivita
Černý čaj	1,01 ± 0,01	0,18	140	185
Zelený čaj	1,08 ± 0,12	0,09	91	159

Zvolení černého či zeleného čaje jako základu energetického nápoje je velice přínosné. Obsah kofeinu je dostatečný abychom tento nápoj klasifikovali jako energetický a zároveň tyto čaje mají poměrně vysokou antioxidační aktivitu a obsahují polyfenoly či flavonoidy, které jsou velice prospěšné a blahodárné pro naše tělo.

Tabulka 34: Návrh částic finálního energetického nápoje

Návrh nového nápoje	Zvolené částice	Celkový obsah jednotlivých složek na porci částic [mg/25 g]			
	Alginátové	Liposomy	Polyfenoly	Vitamin C	Antioxidační aktivita
Vzorek 1	Acai	Acerola	354	661	152
Vzorek 2	Goji		401	667	178
Vzorek 3	Ženšen		363	692	160

Vzhledem k výsledkům senzorické analýzy není vhodné podávat více než 1 druh alginátových částic. Částice liposomové v samotném hodnocení neobstály dobře, ale ve spojení právě s částicemi alginátovými jejich chuť nevadila a je pro nás velice vhodné tyto částice nakombinovat. V teoretické části již bylo uvedeno jak blahodárný účinek má již samotný lecitin na naše tělo, nyní však bude obohacen i extraktem Aceroly. Tento prášek se vyrábí lisováním celých plodů divoké třešně a tak obsahuje nejen vysoký podíl Vitaminu C ale také vitamíny A, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉, E a minerály. Do alginátových částic je použita tinktura Acai určená k podpoře a posílení obranyschopnosti organismu. Tinktura je mimořádně bohatá na vitaminy, minerály a rostlinné látky, které jsou důležité pro správnou funkci imunitního systému. Extrakt Goji podporuje správnou činnost ledvin a jater, snižuje hladinu cholesterolu, chrání cévní systém a podporuje kvalitu vlasů, nehtů a kostí. Jako poslední extrakt do alginátových částic byl zvolen Ženšen, který zlepšuje koncentraci, brání vyčerpání, posiluje bdělost, ale nenarušuje přirozený spánek.

6 ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na vývoj a přípravu nového energetického nápoje. Cílem práce bylo srovnání na trhu dostupných energetických nápojů, stanovení hlavních aktivních složek a návrh nového energetického nápoje včetně jeho základní charakterizace a senzorické analýzy.

V experimentální části práce byla nejprve provedena charakterizace energetických nápojů z hlediska obsahu kofeinu, cukru, polyfenolu či vitamínu C. Zde byly zjištěny výrazné rozdíly, kdy například Semtex obsahoval velice nízké množství kofeinu oproti ostatním nápojům, naopak všechny energetické nápoje obsahovaly několikanásobně větší množství cukru, než je uvedeno na etiketách.

Dále byl navržen vlastní energetický nápoj, jehož základ tvořily vybrané druhy sypaných čajů. Z hlediska polyfenolu byl nejvhodnější matcha čaj, z hlediska kofeinu čaj černý. V další části byly charakterizovány extrakty, jimiž byly energetické nápoje obohaceny. Testovány byly acai, acerola, maca, goji a ženšen. Všechny extrakty obsahovaly velké množství polyfenolu a antioxidačně aktivních látek. Nejvyšší obsah vitamínu C pak obsahoval extrakt Aceroly. Vybrané extrakty byly dále enkapsulovány do různých typů částic. Cílem enkapsulace byla především ochrana polyfenolů, antioxidantů a vitamínu před nepříznivým vlivem žaludečních šťáv a cílený transport do střeva. Byly připraveny dva typy částic, polysacharidové částice z alginátu a liposomové z lecitinu. Enkapsulační účinnost byla měřena z rozdílu koncentrace polyfenolů a antioxidantů před a po enkapsulaci.

Na přípravu liposomu byly použity 2 metody, ultrasonifikace a odpaření na tenké vrstvě. Z hlediska enkapsulační účinnosti vyhovovaly lépe liposomy připravené metodou odpařením na tenké vrstvě, kde vznikají částice multilamelární, tedy částice s větší kapacitou. Největší rozdíl byl zaznamenán u extraktu z Acai, kde se do těchto větších liposomů enkapsulovalo až dvakrát více polyfenolů. Nicméně z hlediska stability vyhovovaly lépe částice připravené ultrasonifikací. Enkapsulační účinnost polyfenolů u těchto liposomů se pohybovala v rozsahu od 51 do 86 %. Rovněž do alginátových částic se extrakty enkapsulovaly velice dobře s účinností 50-77 %. Zmíněné alginátové částice byly připraveny metodou polymerizace pomocí chloridu vápenatého, jejich velikost byla 5 µm. Velikost liposomových částic a jejich stabilita byla měřena pomocí DLS a zeta potenciálu. Průměrná velikost částic se pohybovala od 100 do 200 nm. Stabilita byla mimo interval nestability 30 až 60 mV a lze tedy říct, že všechny liposomové částice byly stabilní. Všechny připravené částice byly dále testovány z hlediska dlouhodobé stability. Alginátové a liposomové částice byly skladovány po dobu 3 měsíců při teplotě 5 °C. Stabilní byly liposomové částice, kde se v průběhu skladování uvolnilo pouze 5 až 30% enkapsulovaného množství polyfenolů. U alginátových částic docházelo k výraznému uvolňování enkapsulovaných složek do roztoku, proto je vhodné je uchovávat mimo vodný roztok.

Na závěr byl vytvořen energetický nápoj, který byl podroben senzorické analýze. Jako nejlepší byl vyhodnocen energetický nápoj se základem z černého či zeleného čaje s alginátovými částicemi Acai, Goji či Ženšenu. Všechny tyto nápoje by byly dále obohaceny o liposomy s enkapsulovaným extraktem Aceroly, která byla pro některé hodnotitele příliš kyselá v alginátových částicích.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Návrh pravidel pro energetické nápoje. Informační centrum bezpečnosti potravin [online]. [cit. 2017-03-22]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/navrh-pravidel-pro-energeticke-napoje.aspx>
- [2] HECKMAN, M.A., K. SHERRY a E. Gonzalez DE MEJIA. Energy Drinks: An Assessment of Their Market Size, Consumer Demographics, Ingredient Profile, Functionality, and Regulations in the United States. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2010, **9**(3), 303-317 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2010.00111.x. ISSN 15414337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2010.00111.x>
- [3] SCHAFFER, Stephen W., Kayoko SHIMADA, Chian Ju JONG, Takashi ITO, Junichi AZUMA a Kyoko TAKAHASHI. Effect of taurine and potential interactions with caffeine on cardiovascular function. *Amino Acids* [online]. 2014, **46**(5), 1147-1157 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1007/s00726-014-1708-0. ISSN 0939-4451. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00726-014-1708-0>
- [4] SEIDL, R., A. PEYRL, R. NICHAM a E. HAUSER. A taurine and caffeine-containing drink stimulates cognitive performance and well-being. *Amino Acids* [online]. 2000, **19**(3-4), 635-642 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1007/s007260070013. ISSN 0939-4451. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s007260070013>
- [5] KENNETH P. CHAMBERS a EDITOR. Caffeine and health research. New York: Nova Biomedical Books, 2009. ISBN 9781607416791.
- [6] SADOCK, Benjamin J. a Virginia A. SADOCK. *Kaplan & Sadock's concise textbook of clinical psychiatry*. 3rd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, c2008. ISBN 0781787467.
- [7] MINERS, John O. a Donald J. BIRKETT. The use of caffeine as a metabolic probe for human drug metabolizing enzymes. *General Pharmacology: The Vascular System* [online]. 1996, **27**(2), 245-249 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/0306-3623(95)02014-4. ISSN 03063623. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0306362395020144>
- [8] SCOTT, M. J., M. EL-HASSAN a A. A. KHAN. Myocardial infarction in a young adult following the consumption of a caffeinated energy drink. *Case Reports* [online]. 2011, **2011**(jun23 1), bcr0220113854-bcr0220113854 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1136/bcr.02.2011.3854. ISSN 1757-790x. Dostupné z: <http://casereports.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bcr.02.2011.3854>
- [9] VARGAS, Bert B. a David W. DODICK. The Face of Chronic Migraine: Epidemiology, Demographics, and Treatment Strategies. *Neurologic Clinics* [online]. 2009, **27**(2), 467-479 [cit. 2017-03-22]. DOI: 10.1016/j.ncl.2009.01.001. ISSN 07338619.

- [10] HAKOOZ, Nancy. Caffeine Metabolic Ratios for the In Vivo Evaluation of CYP1A2, N-acetyltransferase 2, Xanthine Oxidase and CYP2A6 Enzymatic Activities. *Current Drug Metabolism* [online]. 2009, **10**(4), 329-338 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.2174/138920009788499003. ISSN 13892002. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2002&volume=10&issue=4&spage=329>
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733861909000024>
- [11] BAUM, M. a M. WEIß. The influence of a taurine containing drink on cardiac parameters before and after exercise measured by echocardiography. *Amino Acids* [online]. 2001-2-6, **20**(1), 75-82 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1007/s007260170067. ISSN 0939-4451. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s007260170067>
- [12] LAKHAN, Shaheen E, Shefali SABHARANJAK a Ananya DE. Endocytosis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Journal of Biomedical Science* [online]. 2009, **16**(1), 93- [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1186/1423-0127-16-93. ISSN 1423-0127. Dostupné z: <http://www.jbiomedsci.com/content/16/1/93>
- [13] GEORGE P. RÉDEI. *Encyclopedia of genetics, genomics, proteomics, and informatics*. 3rd ed. New York: Springer, 2008. ISBN 9781402067532.
- [14] YOSHIDA, Shinichi, Masuhiro IKEDA, Raul BUSTO, Mercedes SANTISO, Elena MARTINEZ a Myron D. GINSBERG. Cerebral Phosphoinositide, Triacylglycerol, and Energy Metabolism in Reversible Ischemia: Origin and Fate of Free Fatty Acids. *Journal of Neurochemistry* [online]. 1986, **47**(3), 744-757 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1986.tb00675.x. ISSN 00223042. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-4159.1986.tb00675.x>
- [15] JONG J.W., R. FERRARI. *The Carnitine System a New Therapeutical Approach to Cardiovascular Diseases*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1995. ISBN 9789401102759.
- [16] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [17] STRUNECKÁ, Anna a Jiří PATOČKA. *Doba jedová*. Praha: Triton, 2012. ISBN 978-80-7387-469-8.
- [18] LEVINE, As, Kotz CM, Gosnell BA. *Sugars: hedonic aspects, neuroregulation, and energy balance*. The American Journal of Clinical Nutrition. 78: 834S-842S. PMID 14522747.
Dostupné z: <http://www.ajcn.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=14522747>
- [19] SIMONSOHN, Barbara. *Stévie: přírodní alternativa cukru a sladidel: hříšně sladká, ale zdravá*. Praha: Ikar, 2013. ISBN 9788024921273
- [20] STRUNECKÁ, Anna a Jiří PATOČKA. *Doba jedová 2*. Praha: Triton, 2012. ISBN 978-80-7387-555-8.
- [21] Vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. MVČR, Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/mze/>

- [22] KLESCHT, Vladimír, Iva HRNČIŘÍKOVÁ a Lucie MANDELOVÁ. *Éčka v potravinách*. Brno: Computer Press, 2006. Zdraví pro každého. ISBN 80-251-1292-6
- [23] MINDELL, Earl. a Hester. MUNDIS. *Dr. Earl Mindell's Unsafe at any meal: how to avoid hidden toxins in your food*. Chicago: Contemporary Books, c2002. ISBN 065802115X.
- [24] DHANKAR, Ritu, Parmender RATHEE a Arvind K JAIN. HER-2 targeted immunonanoparticles for breast cancer chemotherapy. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* [online]. 2011, 132-139 [cit. 2016-11-30]. Dostupné z: http://www.japsonline.com/admin/php/uploads/50_pdf.pdf
- [25] SURH, Young-Joon. a Lester. PACKER. *Oxidative stress, inflammation, and health*. Boca Raton, FL: Taylor & Francis, 2005. ISBN 9780824727338.
- [26] KOCHAR S.P., Rossell J.B.: v knize *Food Antioxidants* (editor B.J.F. Hudson), Elsevier, str. 19-64, Londýn 1990
- [27] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. 2004, č. 98, s. 174-179.
- [28] RICE-EVANS, Catherine. a Lester. PACKER. *Flavonoids in health and disease*. New York: Marcel Dekker, c2003. ISBN 9780824742348.
- [29] ÖTLEŞ, S. *Methods of analysis of food components and additives*. 2nd ed. Boca Raton: Taylor, 2012, xiv, 519 p. ISBN 978-143-9815-526
- [30] RELIENE, Ramune, Amit SHIRODE, Justin COON, Sameera NALLANTHIGHAL, Dhruva BHARALI a Shaker MOUSA. Nanoencapsulation of pomegranate bioactive compounds for breast cancer chemoprevention. *International Journal of Nanomedicine* [online]. , 475- [cit. 2016-11-30]. DOI: 10.2147/IJN.S65145. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/nanoencapsulation-of-pomegranate-bioactive-compounds-for-breast-cancer-peer-reviewed-article-IJN>
- [31] SHUKLA, Yogeshwer, SRIVASTAVA, BHATNAGAR, SINGH, MISHRA, KUMAR a GUPTA. Synthesis of PLGA nanoparticles of tea polyphenols and their strong in vivo protective effect against chemically induced DNA damage. *International Journal of Nanomedicine* [online]. , 1451- [cit. 2016-12-01]. DOI: 10.2147/IJN.S26364. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/synthesis-of-plga-nanoparticles-of-tea-polyphenols-and-their-strong-in-peer-reviewed-article-IJN>
- [32] SINGH, Madhulika, Priyanka BHATNAGAR, Sanjay MISHRA, Pradeep KUMAR, Yogeshwer SHUKLA a Kailash Chand GUPTA. PLGA-encapsulated tea polyphenols enhance the chemotherapeutic efficacy of cisplatin against human cancer cells and mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. *International Journal of Nanomedicine* [online]. , 6789- [cit. 2016-11-30]. DOI: 10.2147/IJN.S79489. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <https://www.dovepress.com/plga-encapsulated-tea-polyphenols-enhance-the-chemotherapeutic-effi-peer-reviewed-article-IJN>
- [33] WATSON, Ronald R., Victor R. PREEDY a Sherma ZIBADI. *Polyphenols in human health and disease*. ISBN 978-0-12-398456-2.
- [34] GREGORIADIS, Gregory. *Liposome technology*. 3rd ed. New York: Informa Healthcare, 2007. ISBN 978-084-9388-217.

- [35] JORDAN, Edith. Berry Boosters - Acai, Blueberries, Maqui, Goji and Other Popular Berries That Will Improve Your Health [online]. [cit. 2017-03-28]. ISBN 9781312764767.
- [36] AIYER, Harini S., Anni M. WARRI, Denzel R. WOODE, Leena HILAKIVI-CLARKE a Robert CLARKE. Influence of Berry Polyphenols on Receptor Signaling and Cell-Death Pathways: Implications for Breast Cancer Prevention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2012, **60**(23), 5693-5708 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1021/jf204084f. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf204084f>
- [37] SIMONS, Anne. The Healing Power of Plants: Medical Plants from Abuta and Acerola to Yohimbe and Yucca: a Practical Selection. MayaMedia Verlag. 2013. ISBN 3944488067.
- [38] JABLONSKÝ, Ivan a Jiří BAJER. Rostliny pro posílení organismu a zdraví. Praha: Grada, 2007. Česká zahrada. ISBN 978-80-247-1745-6.
- [39] DUŠEK, Karel a Alena VEČEŘOVÁ-PROCHÁZKOVÁ. Diagnostika a terapie duševních poruch. 2., přepracované vydání. Praha: Grada Publishing, 2015. Psyché (Grada). ISBN 978-80-247-4826-9.
- [40] WEBSTER, Thomas J. *Safety of nanoparticles: from manufacturing to medical applications*. New York: Springer, c2009. ISBN 978-0-387-78607-0.
- [41] NEDOVIĆ, Viktor. Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing. London: Springer, 2009. ISBN 978-1-4419-1007-3.
- [42] QUINTANILLA-CARVAJAL, María Ximena, Brenda Hideliza CAMACHO-DÍAZ, Lesvia Sofía MERAZ-TORRES, José Jorge CHANONA-PÉREZ, Liliana ALAMILA-BELTRÁN, Antonio JIMENÉZ-APARICIO a Gustavo F. GUTIÉRREZ-LÓPEZ. Nanoencapsulation: A New Trend in Food Engineering Processing. *Food Engineering Reviews* [online]. 2010, 2(1), 39-50 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1007/s12393-009-9012-6. ISSN 1866-7910. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12393-009-9012-6>
- [43] ĐORĐEVIĆ, Verica, Bojana BALANČ, Ana BELŠČAK-CVITANOVIĆ, et al. Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Engineering Reviews* [online]. 2015, **7**(4), 452-490 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1007/s12393-014-9106-7. ISSN 1866-7910. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12393-014-9106-7>
- [44] EZHILARASI, P. N., P. KARTHIK, N. CHHANWAL a C. ANANDHARAMAKRISHNAN. Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. *Food and Bioprocess Technology* [online]. 2013, **6**(3), 628-647 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1007/s11947-012-0944-0. ISSN 1935-5130. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11947-012-0944-0>
- [45] SHIM, Hee Ryung, Ji-Soo LEE, Hee Sop NAM a Hyeon Gyu LEE. Nanoencapsulation of synergistic combinations of acai berry concentrate to improve antioxidant stability. *Food Science and Biotechnology* [online]. 2016, **25**(6), 1597-1603 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1007/s10068-016-0246-9. ISSN 1226-7708. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10068-016-0246-9>

- [46] SARMENTO, B., A. RIBEIRO, F. VEIGA, P. SAMPAIO, R. NEUFELD a D. FERREIRA. Alginate/Chitosan Nanoparticles are Effective for Oral Insulin Delivery. *Pharmaceutical Research* [online]. 2007-11-5, 24(12), 2198-2206 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1007/s11095-007-9367-4. ISSN 0724-8741. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-007-9367-4>
- [47] OBRADOVIC, Bojana, Jasmina STOJKOVSKA, Zeljka JOVANOVIC a Vesna MISKOVIC-STANKOVIC. Novel alginate based nanocomposite hydrogels with incorporated silver nanoparticles. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2012, 23(1), 99-107 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1007/s10856-011-4522-1. ISSN 0957-4530. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-011-4522-1>
- [48] XU, Xiaoming, Antonio COSTA a Diane J. BURGESS. Protein Encapsulation in Unilamellar Liposomes: High Encapsulation Efficiency and A Novel Technique to Assess Lipid-Protein Interaction. *Pharmaceutical Research* [online]. 2012, 29(7), 1919-1931 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1007/s11095-012-0720-x. ISSN 0724-8741. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-012-0720-x>
- [49] LIERS, Hank. BENEFITS OF LIPOSOMAL NUTRIENTS (LIPOSOMES). In: *Integrated health blog* [online]. 2016 [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: <http://www.integratedhealthblog.com/tag/lipid-bilayer/>
- [50] CAVALCANTI, Suellen M. T., Cláudia NUNES, Sofia A. C. LIMA, José L. SOARES-SOBRINHO a Salette REIS. Multiple Lipid Nanoparticles (MLN), a New Generation of Lipid Nanoparticles for Drug Delivery Systems: Lamivudine-MLN Experimental Design. *Pharmaceutical Research* [online]. , - [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1007/s11095-017-2136-0. ISSN 0724-8741. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-017-2136-0>
- [51] Ultrasonic Liposome Preparation. Hielscher: Ultrasound Technology [online]. 2017 [cit. 2017-04-29]. Dostupné z: <http://www.hielscher.com/>
- [52] Avanti Polar Lipids, Ing. Preparation of liposomes [online]. 2017 [cit. 2017-04-29]. Dostupné z: <http://www.avantilipids.com/>
- [53] DEAMER, David W. a Gail L. BARCHFELD. Encapsulation of macromolecules by lipid vesicles under simulated prebiotic conditions. *Journal of Molecular Evolution* [online]. 1982, 18(3), 203-206 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1007/BF01733047. ISSN 0022-2844. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01733047>
- [54] NIKOLAI V. TKACHENKO. Optical Spectroscopy Methods and Instrumentations. Burlington: Elsevier, 2006. ISBN 978-008-0461-724.
- [55] KVÍTEK, Libor. Metody studia koloidních soustav: Prozatímní učební text. Olomouc: PřF UP Olomouc, Katedra fyzikální chemie, 2006. Dostupné z: <http://chemikalie.upol.cz/skripta/msk/msk.pdf>
- [56] BAND, Yehuda Benzion. *Light and matter: electromagnetism, optics, spectroscopy and lasers*. Chichester: John Wiley, c2006. ISBN 978-0-471-89931-0.
- [57] ROBERT J. HUNTER a . *Zeta potential in colloid science: principles and applications*. New paperback ed. London ; Toronto: Academic, 1981. ISBN 9780123619617.

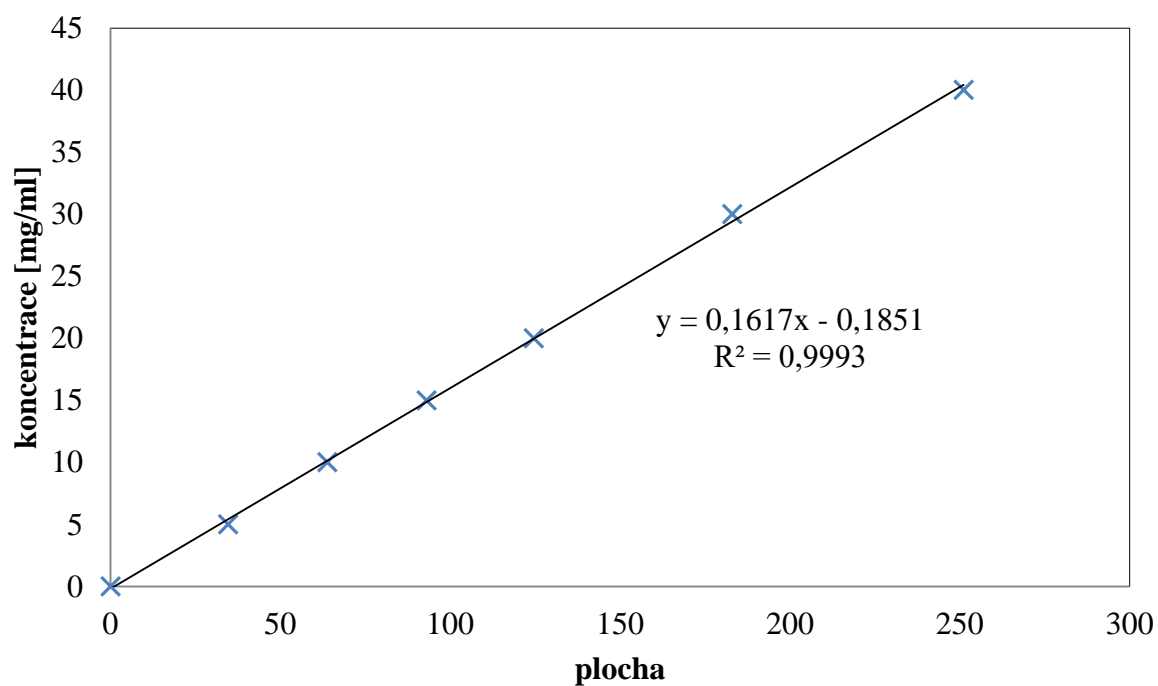
- [58] Zeta potential [online]. [2016-11-24]. TAPPI. Dostupné zWWW: <http://www.tappi.org/content/events/11BIMSPR/papers/Yu.pdf>.
- [59] NOVÁKOVÁ, Lucie. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, 299 s. . ISBN 978-80-260-4243-3.
- [60] LUNDANES, Elsa, Léon REUBSAET a Tyge GREIBROKK. *Chromatography: basic principles, sample preparations and related methods*. ISBN 978-3-527-33620-3.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

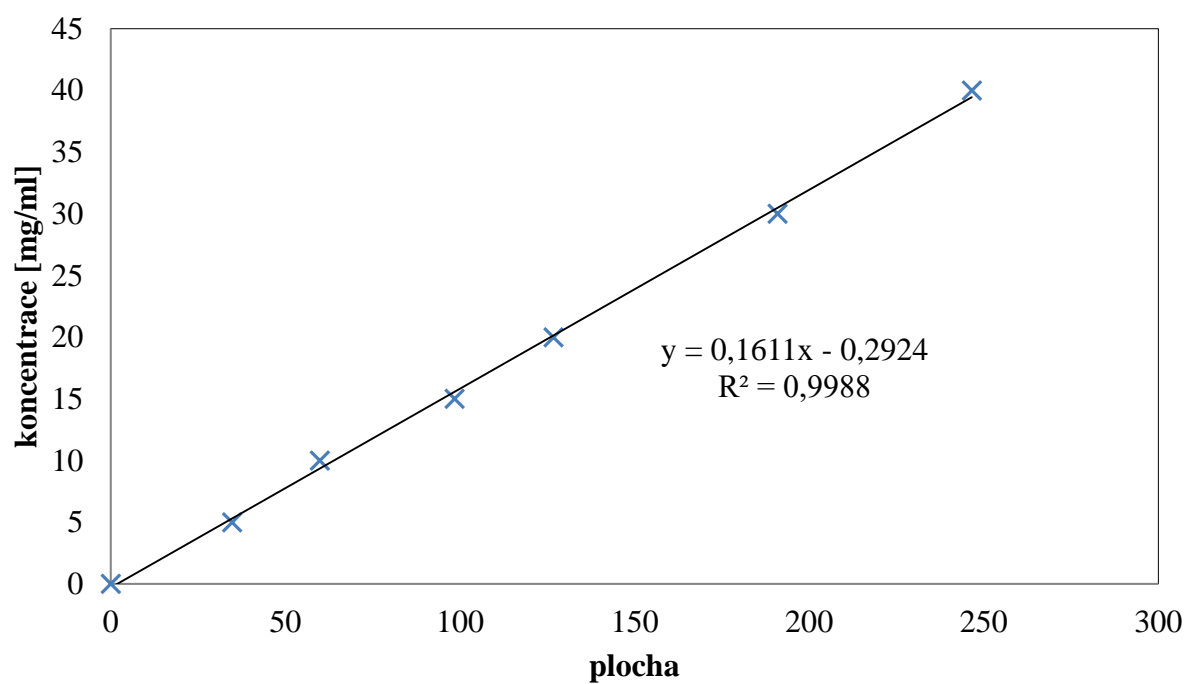
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
AMP	Adenosine monophosphate
ATP	Adenosine triphosphate
HPLC	High performance liquid chromatography
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
TAA	Total antioxidant activity
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

9 PŘÍLOHY

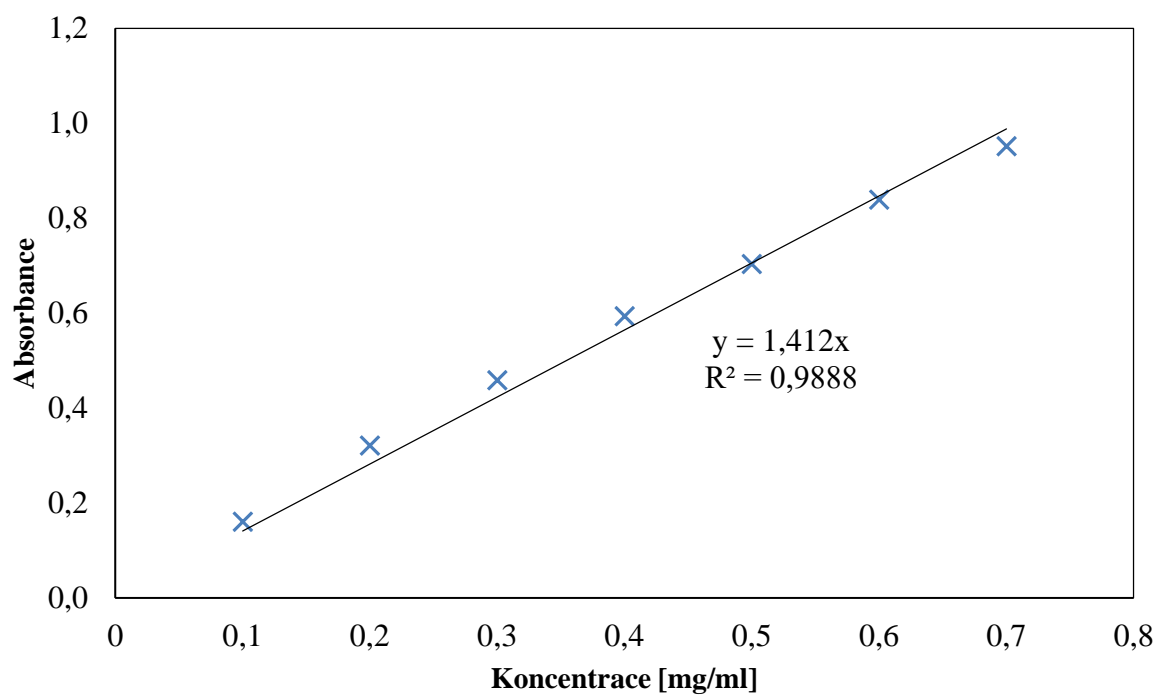
9.1 Kalibrační křivky



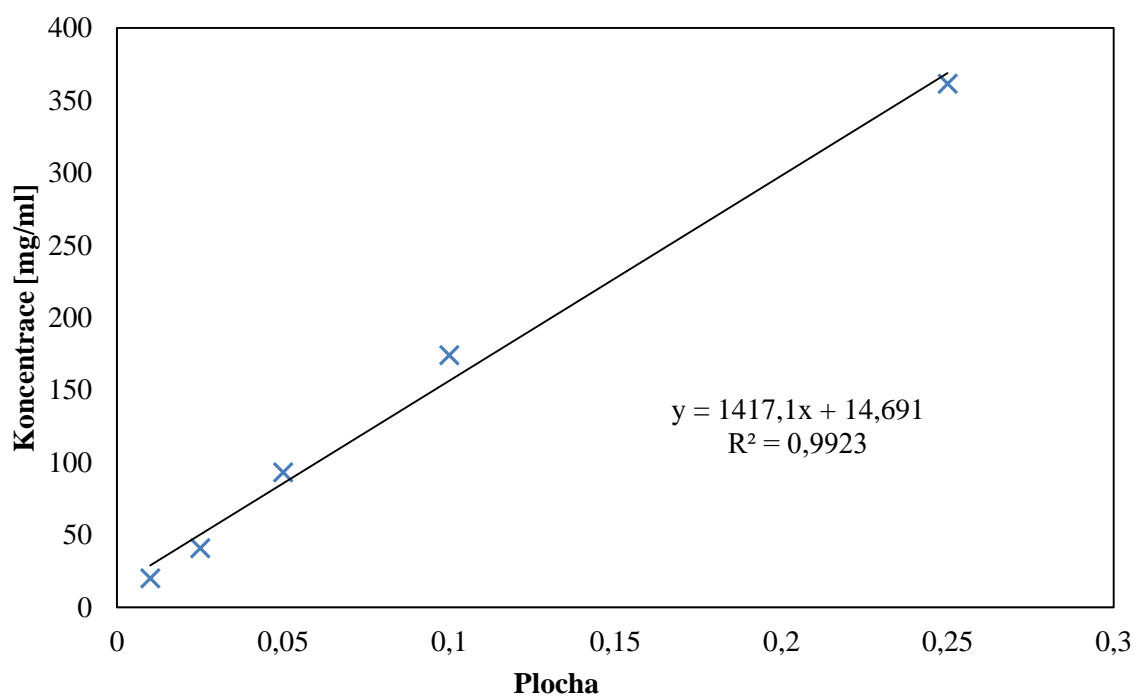
Graf 21: Kalibrační křivka fruktozy



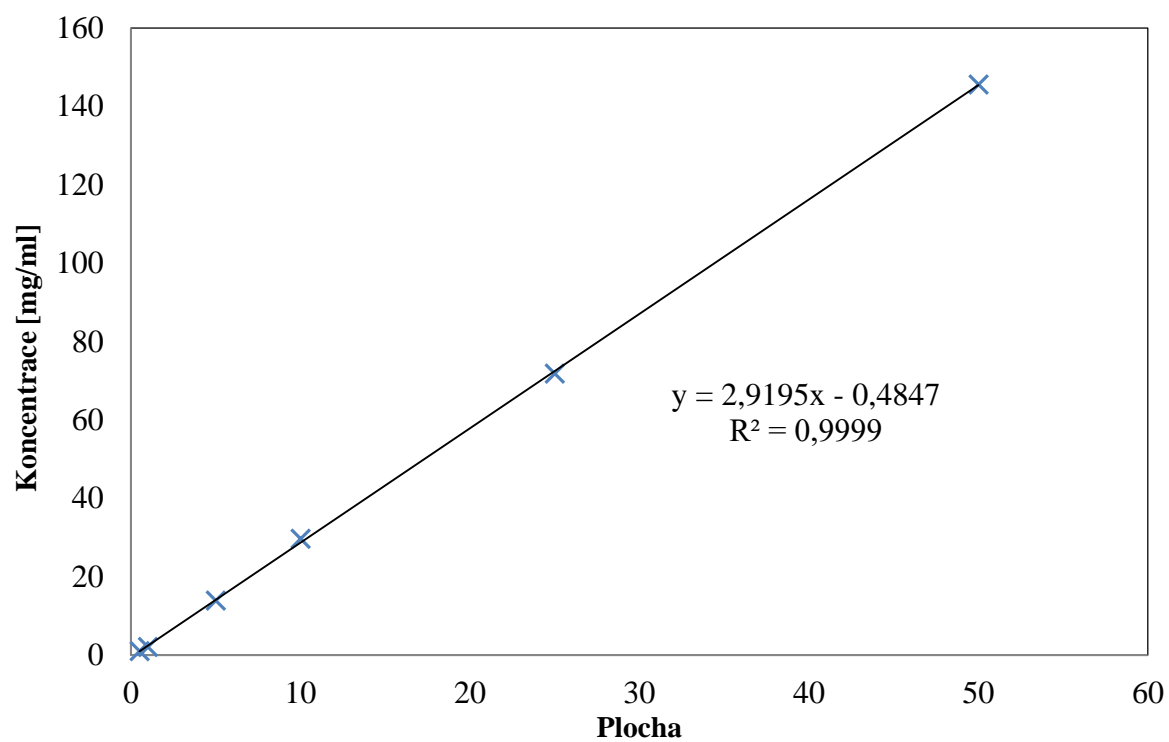
Graf 22: Kalibrační křivka glukózy



Graf 23: Kalibrační křivka kyseliny gallové

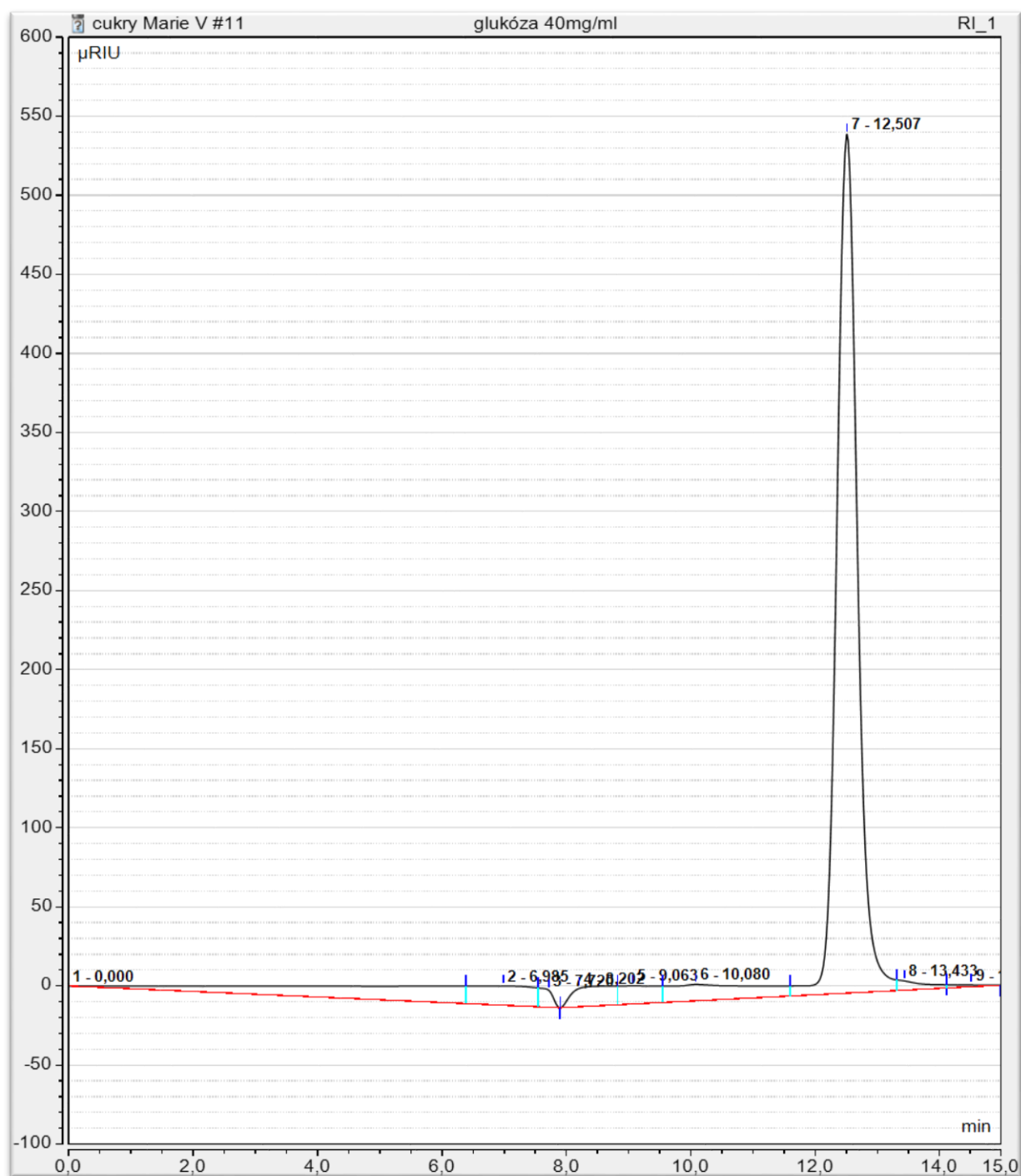


Graf 24: Kalibrační křivka kofeinu



Graf 25: Kalibrační křivka vitaminu C

9.2 Chromatogram



Obrázek 11: Ukázka chromatogramu pro vzorek glukózy z kalibrační křivky

9.3 Dotazník pro senzorické hodnocení nového typu energy drinku

Datum:

Čas:

Kuřák: Ano - Ne

Muž - Žena

Věk:

1. Jak často pijete energy drinky?

- a) Denně
- b) Více než 3x týdně
- c) 1x týdně
- d) 1x měsíčně
- e) Občas
- f) Nepiji

2. Jak často pijete kávu?

- a) Více než 3x denně
- b) Denně
- c) Více než 3x týdně
- d) 1x týdně
- e) 1x měsíčně
- f) Občas
- g) Nepiji

3. Jak často pijete čaj?

- a) Více než 3x denně
- b) Denně
- c) Více než 3x týdně
- d) 1x týdně
- e) 1x měsíčně
- f) Občas
- g) Nepiji

4. Senzorické hodnocení vzorků pomocí stupnice

Senzoricky zhodnoťte - Vzhled a barvu, Chut', Vůni, Konzistenci

Oznámkuje jako ve škole: 1 - Vynikající; 2 - Velmi dobrá; 3 - Dobrá; 4 - spokojivá; 5 - Nevyhovující

	Vzhled a barva	Chut'	Vůně	Konzistence	Celkové hodnocení
Základ 1					
Základ 2					
Základ 3					
Základ 4					

5. Senzorické hodnocení vzorků pomocí stupnice

Senzoricky zhodnoťte - Vzhled a barvu, Chut', Vůni, Konzistenci

Oznámujte jako ve škole: 1 - Vynikající; 2 - Velmi dobrá; 3 - Dobrá; 4 - spokojivá; 5 - Nevyhovující

	Vzhled a barva	Chut'	Vůně	Konzistence	Celkové hodnocení
1A					
2A					
3A					
4A					
5A					

6. Senzorické hodnocení vzorků pomocí stupnice

Senzoricky zhodnoťte - Vzhled a barvu, Chut', Vůni, Konzistenci

Oznámujte jako ve škole: 1 - Vynikající; 2 - Velmi dobrá; 3 - Dobrá; 4 - spokojivá; 5 - Nevyhovující

Zvolený základ:					
	Vzhled a barva	Chut'	Vůně	Konzistence	Celkové hodnocení
VZ1					
VZ2					
VZ3					
VZ4					
VZ5					

7. Pořadový test

Seřaďte vzorky podle Vašich preferencí (1 – vzorek nejlepší, nepříjemnější → 5 – vzorek nejhorší, nepříjemný). Dva a více vzorků nesmí mít stejné pořadí.

Číslo pořadí	Označení vzorku
1.	
2.	
3.	
4.	
5.	

8. Poznámky

vzorek	poznámka